

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JASON LEE FURUIE

DESENVOLVIMENTO DE SONDA CADEADO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR  
DE *Histoplasma capsulatum* BASEADO NA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO EM  
CÍRCULO ROLANTE (RCA)

CURITIBA  
2014

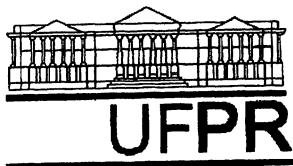
JASON LEE FURUIE

DESENVOLVIMENTO DE SONDA CADEADO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR  
DE *Histoplasma capsulatum* BASEADO NA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO EM  
CÍRCULO ROLANTE (RCA)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de concentração em Saúde Humana e Animal, Departamento de Engenharia de Bioprocessos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vania Aparecida Vicente

CURITIBA  
2014



## RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e três dias do mês de maio de 2014, na Sala de Aula do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica no Setor de Ciências Biológicas do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Octuagésima Sétima Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Prof Dr Carlos Pelleschi Taborda (USP), Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Kava-Cordeiro (UFPR), Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marisol Dominguez Muro (UFPR) e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vania Aparecida Vicente (UFPR – orientadora da dissertação).

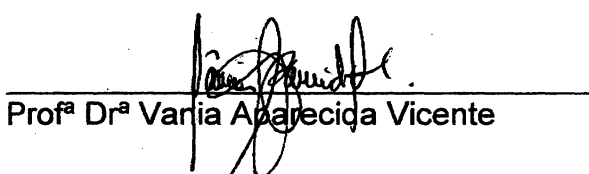
Às 09h30, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Jason Lee Furuie**, a fazer a apresentação da dissertação intitulada: **“Desenvolvimento de sonda cadeado para diagnóstico molecular de *Histoplasma capsulatum* baseado na técnica de amplificação em círculo rolante (RCA)”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

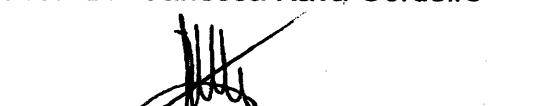
Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Prof Dr Carlos Pelleschi Taborda, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Kava-Cordeiro, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marisol Dominguez Muro e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vania Aparecida Vicente declarou o candidato aprovado (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 23 de Maio de 2014.

  
Prof Dr Carlos Pelleschi Taborda

  
Profª Drª Vanessa Kava-Cordeiro

  
Profª Drª Vania Aparecida Vicente

  
Profª Drª Marisol Dominguez Muro

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por guiar meus passos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vania Aparecida Vicente, pela sábia orientação e palavras de força, pela amizade, disposição permanente e pelo apoio em todos os momentos.

À Coordenação do PPGEGB da UFPR, pela possibilidade de desenvolver este trabalho e a todos os docentes do programa, pelos ensinamentos.

Ao Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR, representado por seus técnicos e doutores, pelo espaço físico, conhecimento e tempo cedidos.

Ao Prof. Dr. Jiufeng Sun, da Universidade de Sun Yat-Sen, Guangzhou - China, pela contribuição e auxílio durante todo o processo prático deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Vicente Teixeira Pinto, pelo apoio constante na minha busca pelo aperfeiçoamento pessoal e profissional.

À minha família, pelo amor incondicional e principalmente à minha mãe Prof<sup>a</sup>. Me. Lesly Miki Abe Furuie, por ser meu exemplo de vida e fonte de eterno orgulho.

A todos os amigos do LabMicro-Biomol, pelo convívio e pelos ensinamentos, em especial às doutorandas do PPGMPP da UFPR Mariana do Nascimento e Germana dos Santos, pelo companheirismo, cumplicidade, parceria, ensinamentos, orientação e convívio.

Aos colegas do PPGEGB da UFPR, pelos bons momentos durante o curso.

Aos servidores técnico-administrativos do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR Evelin Balbo, Eliana Leite, Manoel Figueiredo, Luciane Hennig, Luciana Correia, Fabio Chimentão e Izabel de Lima, pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis, pelas injeções de ânimo e por terem entendido e suprido minha ausência no laboratório.

Aos amigos queridos e a todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho, pelo apoio, palavras de conforto e por entenderem minha ausência em seus dias.

Meus sinceros e eternos agradecimentos!

“Combati o bom combate  
Completei a carreira  
Guardei a fé.”  
(2Tim 4: 6-8)

## RESUMO

*Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico que cresce de forma filamentosa e produz hifas aéreas a temperaturas entre 25°C e 30°C, mas que sofre morfogênese para a fase leveduriforme a 37°C. Este fungo é considerado um importante patógeno e desenvolve-se em solos enriquecidos por excrementos de aves e morcegos, podendo ser isolado de ambientes onde vivem e se acumulam tais animais. A histoplasmose humana é causada por duas variedades do mesmo fungo, predominando *H. capsulatum* var. *capsulatum* nos Estados Unidos, América do Sul, Europa e alguns países da América Central e *H. capsulatum* var. *duboisii* nas regiões oeste e central da África. O espectro clínico da doença varia desde infecções assintomáticas à histoplasmose disseminada, podendo acometer tanto pacientes imunocomprometidos ou imunossuprimidos, quanto imunocompetentes. O diagnóstico convencional nem sempre é preciso, por isso são necessários métodos mais eficazes para a detecção de *H. capsulatum* em regiões endêmicas, onde o diagnóstico tardio da histoplasmose disseminada progressiva resulta em alta mortalidade. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma sonda cadeado para diagnóstico rápido de *H. capsulatum* com base na técnica de amplificação em círculo rolante (RCA). Sequências do espaçador interno transcrito (ITS) do DNAr de 177 linhagens de *H. capsulatum* foram usadas para projetar duas sondas cadeado a serem utilizadas para a detecção de polimorfismos de nucleotídeo único. Entre as duas sondas cadeado sintetizadas, uma mostrou ser 100% sensível e específica, quando testada em DNA de 29 amostras clínicas de *H. capsulatum*, não apresentando reação cruzada em amostras de DNA de 06 linhagens de fungos utilizadas como controles negativos (*Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Scedosporium* sp. e *Trichophyton* sp.), além de DNA de *Leishmania brasiliensis*. Sendo assim, verificou-se que a sonda cadeado HcPL2 associada à técnica de RCA pode ser utilizada para o diagnóstico de *H. capsulatum* de maneira rápida e precisa, sendo uma importante proposta à substituição de técnicas de diagnóstico convencionais.

Palavras-chave: Histoplasmose, *Histoplasma capsulatum*, Diagnóstico rápido, Sonda cadeado, RCA.

## ABSTRACT

*Histoplasma capsulatum* is a dimorphic fungus that grows in a filamentous form and produces aerial hyphae at temperatures between 25°C and 30°C, but undergoes morphogenesis for yeast phase at 37°C. This fungus is considered an important pathogen and develops in soils enriched by droppings of birds and bats, can be isolated from environments where live and accumulates such animals. Human histoplasmosis is caused by two strains of the same fungus, *H. capsulatum* var. *capsulatum* predominating in the United States, South America, Europe and some countries in Central America, and *H. capsulatum* var. *duboisii* in western and central Africa. The clinical spectrum of disease ranges from asymptomatic to disseminated histoplasmosis infections and can affect immunocompromised or immunosuppressed patients as immunocompetent. By presenting a conventional diagnosis often not accurate, more efficient methods are necessary to detect *H. capsulatum* in endemic regions, where the late diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis results in high mortality. This study aimed to develop a padlock probe for rapid diagnosis of *H. capsulatum* based on the technique of rolling circle amplification (RCA). Sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of 177 rDNA *H. capsulatum* strains were used to design two padlock probes to be used for detecting single nucleotide polymorphisms. Between the two padlock probes synthesized, one was found to be 100% sensitive and specific when tested on 29 clinical samples of DNA from *H. capsulatum*, showing no cross reaction with DNA samples from 06 strains of fungi used as negative control (*Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Scedosporium* sp. and *Trichophyton* sp. and DNA from *Leishmania brasiliensis*. Therefore, it has been found that the padlock probe HcPL2 associated with RCA technique can be used to the diagnosis of *H. capsulatum* quickly and accurately, and is an important proposal to replace conventional diagnostic techniques.

Keywords: Histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, Rapid diagnosis, Padlock probe, RCA.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MACROMORFOLOGIA DE ISOLADO DE <i>Histoplasma capsulatum</i> em Ágar Sabouraud (SAB).....	19
FIGURA 2 – MICROMORFOLOGIA DE ISOLADO DE <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> . ....	20
FIGURA 3 – REGIÕES ESPAÇADORAS INTERGÊNICAS ITS1 E ITS2 DO DNAr .	31
FIGURA 4 – EXEMPLO DE APLICAÇÃO DE SONDAS CADEADO ASSOCIADAS À TÉCNICA DE RCA.....	35
FIGURA 5 – SEQUÊNCIAS ITS DO DNAr DE <i>H. capsulatum</i> UTILIZADAS PARA O DESENHO DA SONDA CADEADO .....	42
FIGURA 6 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS ETAPAS DOS PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS. ....	44
FIGURA 7 – SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DE ANELAMENTO DAS SONDAS HcPL1 E 2 LOCALIZADAS NO INÍCIO DA REGIÃO ITS1 .....	46
FIGURA 8 – PRODUTOS DE LIGAÇÃO DA SONDA CADEADO HcPL2.....	47
FIGURA 9 – PRODUTOS DE LIGAÇÃO DA SONDA CADEADO HcPL2.....	47
FIGURA 10 – PRODUTOS DA LIGAÇÃO CRUZADA DA SONDA CADEADO HcPL1 COM OUTRAS ESPÉCIES DE FUNGOS .....	48
FIGURA 11 – PRODUTOS DE LIGAÇÃO DA SONDA CADEADO HcPL2 COM E SEM TRATAMENTO .....	49
FIGURA 12 – PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DAS REAÇÕES DE RCA DOS PRODUTOS DE LIGAÇÃO DA SONDA CADEADO HcPL2 .....	49
FIGURA 13 – PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DAS REAÇÕES DE RCA DOS PRODUTOS DE LIGAÇÃO DA SONDA CADEADO HcPL2 .....	50
FIGURA 14 – PERFIL NEGATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DAS REAÇÕES DE RCA PARA CONTROLES NEGATIVOS. ....	50



## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1– SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES LABORATORIAIS PARA HISTOPLASMOSE. ....	26
QUADRO 2 - CÓDIGO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Histoplasma capsulatum</i> ESTUDADOS .....	39
QUADRO 3 - SEQUÊNCIAS DAS SONDAS CADEADO E <i>PRIMERS</i> USADOS NESTE ESTUDO. ....	45

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

® - Marca Registrada

18S - Subunidade Ribossomal Menor

28S - Subunidade Ribossomal Maior

μM - Micrometro

μL - Microlitro

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

DNAr – *Ribosomal Deoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal

DNTP – *Deoxyribonucleotide Triphosphate* - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA- *Ethylenediaminetetraacetic Acid* - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

g – Força G

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* / Vírus da Imunodeficiência Humana

ICBN – *International Code of Botanical Nomenclature* - Código Internacional de Nomenclatura Botânica

ITS – *Internal Transcribed Spacer* - Espaçador Interno Transcrito

mg- Miligramas

mg/kg – Miligramas por Quilo

MgCl – Cloreto de Magnésio

NaOH - Hidróxido de Sódio

ng - Nanogramas

pb - Pares de Bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* - DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente

RCA – *Rolling Circle Amplification* - Amplificação em Círculo Rolante

SAB – Sabouraud Dextrose Ágar

SNC – Sistema Nervoso Central

TM – *Melting Temperature* – Temperatura de Fusão

UFPR – Universidade Federal do Paraná

V – Volts

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	OBJETIVOS .....	13
2.1	GERAL .....	13
2.2	ESPECÍFICOS .....	13
3	REVISÃO .....	14
3.1	HISTOPLASMOSE .....	14
3.2	O FUNGO <i>Histoplasma capsulatum</i> .....	17
3.3	EPIDEMIOLOGIA .....	21
3.4	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS .....	24
3.5	DIAGNÓSTICO .....	26
3.5.1	Amplificação em círculo rolante (RCA) .....	33
3.5.1.1	Sonda cadeado baseada na técnica de RCA .....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	38
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL .....	38
4.3	QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL .....	40
4.4	AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ITS DO DNAr .....	40
4.5	SELEÇÃO DA REGIÃO GÊNICA DE ANELAMENTO DA Sonda .....	41
4.5.1	Desenho da sonda cadeado .....	41
4.5.2	Ligação da sonda cadeado .....	42
4.5.3	Reação de amplificação em círculo rolante (RCA) .....	43
4.5.4	Aplicação da sonda cadeado: Etapas metodológicas .....	43
5	RESULTADOS .....	45
6	DISCUSSÃO .....	51
7	CONCLUSÃO .....	56
8	REFERÊNCIAS .....	57
	ANEXOS .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

A histoplasmose é uma doença sistêmica com casos relatados em todo o mundo e é considerada uma das micoses mais comumente diagnosticadas em pacientes imunocomprometidos (CHAKRABARTI; SLAVIN, 2011).

O espectro clínico da histoplasmose varia desde infecção assintomática à histoplasmose disseminada, dependendo da intensidade da exposição ao microrganismo e do estado imunológico do indivíduo exposto (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2012). A doença pode ocorrer nas formas primária, pulmonar crônica e disseminada (BRAZÃO-SILVA *et al.*, 2013).

Indivíduos com o sistema imunológico comprometido correm o risco de desenvolver a histoplasmose em sua forma disseminada, frequentemente caracterizada por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e lesões cutâneas (WHEAT *et al.*, 2007).

Na maior parte das regiões consideradas endêmicas (Estados Unidos, América do Sul, Europa e em alguns países da América Central), a doença em humanos tem como agente etiológico o fungo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, no entanto, nas regiões oeste e central do continente africano, a variedade encontrada é *H. capsulatum* var. *duboisii* (GUARNER; BRANDT, 2011). Em animais, *H. capsulatum* var. *farciminosum* tem sido descrito como agente causal em equinos (KAUFFMAN, 2007), enquanto que em morcegos e aves já foram isolados *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii* (DIAS, 2009; QUIST *et al.*, 2011). O diagnóstico clínico da histoplasmose é dificultado pelo fato de que as principais manifestações da micose são muito semelhantes a de outras doenças oportunistas relacionadas com baixa imunidade do hospedeiro, como as causadas pelos fungos *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium marneffe* (SUN *et al.*, 2011), *Paracoccidioides brasiliensis* e ainda pelo parasito *Leishmania brasiliensis*, em áreas endêmicas no Brasil (CALZA *et al.*, 2003). Assim, há uma necessidade de se identificar o agente etiológico da doença de maneira rápida e simples, mediante a adoção de métodos diagnósticos precisos. Ferramentas como PCR-RT (BUIRAGO *et al.*, 2006), PCR-Multiplex (ELÍAS *et al.*, 2012) e LAMP (SCHEEL *et al.*, 2014), têm sido utilizadas para o diagnóstico molecular da histoplasmose.

A técnica de amplificação em círculo rolante (RCA) é um método isotérmico de síntese de hibridização enzimática por determinadas DNA polimerases, que resultam em centenas de bilhões de pequenas cópias lineares únicas de DNA. Esta reação é iniciada pela hibridação de uma fita de DNA linear simples para um minicírculo de DNA específico. As sondas cadeado hibridizam com um DNA alvo, através do qual as duas extremidades da sonda se justapõem e podem ser ligadas por uma DNA ligase quando ambas as extremidades da sonda mostram uma perfeita complementaridade (NAJAFZADEH *et al.*, 2011).

Recentemente, o uso de sondas cadeado aliado à técnica de RCA tem auxiliado significativamente no diagnóstico de diferentes tipos de micoses e tem sido relatado por sua boa reprodutibilidade e sensibilidade (LACKNER *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2013; HAMZEHEI *et al.*, 2013; NAJAFZADEH *et al.*, 2013), demonstrando a importância na melhoria de ferramentas moleculares como essa, para identificação de espécies de interesse em saúde humana na área diagnóstica.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver uma sonda cadeado baseada na técnica de amplificação em círculo rolante (RCA), a partir de sequências da região ITS do genoma de *H. capsulatum*, a fim de se estabelecer uma forma de diagnóstico rápido, eficaz e específico para *H. capsulatum* em amostras clínicas e ambientais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma sonda para diagnóstico de *Histoplasma capsulatum* baseado na técnica de amplificação em círculo rolante (RCA).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Selecionar regiões específicas de sequências ITS das três variedades descritas de *H. capsulatum* (var. *capsulatum*, var. *duboisii* e var. *farciminosum*) para o desenvolvimento de uma sonda cadeado específica para *H. capsulatum*;

Desenhar uma sonda molecular modelo cadeado baseada na técnica de RCA;

Testar a sonda desenhada em amostras de DNA genômico de *H. capsulatum*.

### 3 REVISÃO

#### 3.1 HISTOPLASMOSE

A histoplasmose é uma infecção também conhecida como doença de Darling, endêmica nos Estados Unidos, em alguns países da América Central e América do Sul, África e Europa (FERREIRA *et al.*, 2002; MATA-ESSAYAG, 2008; RAPPO *et al.*, 2010; GUARNER; BRANDT, 2011; HIGHLAND *et al.*, 2011; CRUZ, 2013; BRANDÃO *et al.*, 2014). É causada pelo fungo *Histoplasma capsulatum* após a inalação de conídios presentes no solo contaminado principalmente por excretas de morcegos e de certas aves das ordens Columbiformes e Galliformes (WOODS *et al.*, 2001; KAUFFMAN, 2009; MANDELL *et al.*, 2010).

Características como umidade e acidez do solo estão diretamente associadas à ocorrência do fungo no ambiente e o fungo causador da histoplasmose, mesmo que em baixa prevalência, foi isolado a partir de vísceras e de fezes de morcegos no estado de São Paulo por Dias (2009) e em um exemplar de papagaio da espécie *Eclectus parrot* por Quist e colaboradores (2011).

A manifestação da histoplasmose se dá no pulmão do hospedeiro, onde a mudança de temperatura para 37°C causa a conversão de *H. capsulatum* em células de leveduras patogênicas (MUKHOPADHYAY; KATZENSTEIN, 2010; HOLBROOK *et al.*, 2013).

Durante a fase parasitária, o fungo é capaz de disseminação hematológica do sistema pulmonar para outros órgãos. Os lugares mais comuns de disseminação da doença são pele, fígado, baço, trato gastrointestinal e medula óssea. A presença do fungo em partes do sistema nervoso central e envolvimento cardíaco podem aumentar o risco de complicações no paciente (KAUFFMAN, 2007; GUARNER; BRANDT, 2011).

A histoplasmose pode ocorrer nas formas primária, pulmonar crônica, que geralmente ocorre na presença de alguma doença pulmonar subjacente, ou ainda mucocutânea crônica, capaz de produzir lesões ulcerativas, comumente observadas na língua, palato e mucosa bucal (MUZYKA; EPIFANIO, 2013) e, disseminada,

caracterizada pela propagação da infecção para sítios extra-pulmonares (TAYLOR *et al.*, 2005; BRAZÃO-SILVA *et al.*, 2013), com predileção ao sistema retículo endotelial.

A grande maioria das infecções por *H. capsulatum* é completamente assintomática ou, pelo menos, subclínica. A doença sofre ação do sistema imunológico do hospedeiro espontaneamente ao longo de um período de 2 a 4 semanas (KAUFFMAN, 2007; FERREIRA; BORGES, 2009; AKIN; HERFORD; CICCÌÙ, 2011; DAL BELLO *et al.*, 2011). No entanto, dependendo do nível da exposição ao organismo e do estado imunológico do hospedeiro, pode se tornar generalizada e potencialmente fatal (BABADY *et al.*, 2011).

Entre os pacientes sintomáticos, a apresentação clínica mais comum é a pneumonia aguda (KAUFFMAN, 2009; MCKINSEY; MCKINSEY, 2011). Pessoas com o sistema imunológico comprometido correm o risco de desenvolver a histoplasmose em sua forma disseminada, frequentemente caracterizada por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e lesões cutâneas (FERREIRA *et al.*, 2002; KAUFFMAN, 2007; WHEAT *et al.*, 2007). Como as características clínicas são similares a outras doenças febris sistêmicas, a maioria das vezes o diagnóstico inicial é tuberculose (O'SULLIVAN *et al.*, 2004; MAUBON, 2007; ZÖLLNER *et al.*, 2010). A doença pulmonar ou extrapulmonar mais grave pode ser fatal quando o diagnóstico se dá tardiamente ou se o tratamento não for rapidamente iniciado (ELÍAS *et al.*, 2012).

A disseminação para o sistema nervoso central (SNC) é limitada para as meninges, medula espinhal e cérebro. Os pacientes podem apresentar meningite subaguda ou crônica, lesões cerebrais ou espinhais focais, derrames e encefalite. Clinicamente, este padrão de difusão é reconhecido em 10% a 20% dos casos de histoplasmose (VEERAVAGU *et al.*, 2013).

Embora a doença geralmente apresente-se na sua forma primária em indivíduos saudáveis, a maioria dos casos envolvendo pacientes imunocomprometidos, mostra sinais de uma infecção de forma disseminada potencialmente fatal (MATULIONYTE *et al.*, 2005). A histoplasmose disseminada tem emergido como uma importante infecção oportunista entre os pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e aqueles em áreas endêmicas. É considerada uma das micoses sistêmicas mais comuns em pacientes portadores do vírus HIV em todo o mundo (WANG *et al.*, 1996; GE *et al.*, 2010).



Além de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), vários casos de histoplasmose disseminada têm sido observados em lactantes, idosos, transplantados, imunossuprimidos, devido às condições imunológicas alteradas destes pacientes (CASSOTI *et al.*, 2006; WHEAT *et al.*, 2007; ANTONELLO *et al.*, 2011).

Em casos de pacientes que passaram por transplante de órgãos, pode-se observar disfunção imune significativa devido à imunossupressão (CUELLAR-RODRIGUEZ *et al.*, 2009; GRIM *et al.*, 2012). A infecção por *H. capsulatum* nestes casos, pode ser de difícil diagnóstico, uma vez que o paciente pode apresentar variação nos sintomas e na resposta à terapêutica, o que pode aumentar o risco de complicações (ASSI *et al.*, 2013).

Medicamentos antifúngicos são usados para tratar casos graves de histoplasmose aguda, crônica e disseminada, sendo que a terapêutica da histoplasmose varia de acordo com a síndrome clínica e o estado imune do hospedeiro. O tratamento típico de doença grave envolve primeiro o tratamento com anfotericina B, seguido por itraconazol via oral (FERREIRA; BORGES, 2009). O tratamento com itraconazol tende a continuar por pelo menos um ano em casos graves, enquanto na histoplasmose pulmonar aguda, 6 a 12 semanas são suficientes. Alternativas ao itraconazol são posaconazol, voriconazol e fluconazol (WHEAT; MUSIAL; JEMY-AVITAL, 2005). Indivíduos que tratados com itraconazol devem ter sua função hepática monitorada pela alta exposição ao medicamento (MOEN *et al.*, 2009).

Tanto para pacientes com a forma grave da doença quanto para pacientes com a forma moderada, o tratamento mais comum se dá através da administração de anfotericina B, seguido por terapia com azólicos (ASSI *et al.*, 2013).

A maioria dos pacientes acometidos pela forma pulmonar aguda e suas complicações mostra resolução espontânea dos quadros clínicos, laboratorial e radiológico, sem necessidade de tratamento específico; porém se necessário, administra-se itraconazol, via oral, na dose de 200 mg, três vezes ao dia e depois 200 a 400 mg por dia durante 6 a 12 semanas. As formulações lipossomais de anfotericina B, são as mais indicadas no tratamento por serem menos nefrotóxicas, as quais podem ser empregadas, por via endovenosa, durante 1 a 2 semanas e em

seguida associada ao tratamento com itraconazol no período de 12 semanas (WHEAT *et al.*, 2007; HAGE *et al.*, 2008).

Na forma pulmonar crônica, a droga de escolha é o itraconazol na mesma dosagem recomendada para a forma pulmonar aguda, com tempo de tratamento de 18 a 24 meses. Recidivas ocorrem em 10 a 15% dos casos após a retirada dos medicamentos, sendo que o monitoramento dos mesmos deve persistir por pelo menos um ano após a retirada da droga (FERREIRA; BORGES, 2009; ASSI *et al.*, 2013).

Na terapia primária da histoplasmose disseminada, particularmente nos pacientes imunocomprometidos, a anfotericina B é a droga de escolha e deve ser administrada numa dose total de 35 mg/kg. As recidivas nesses casos também são comuns, portanto a terapêutica de manutenção a longo prazo é aconselhada, seja com anfotericina B ou com itraconazol (WHEAT *et al.*, 2007).

Mulheres grávidas portadoras de qualquer forma da micose devem ser tratadas com anfotericina B (desoxicolato ou lipossomal), uma vez que os triazólicos são contra-indicados em gestantes (FERREIRA; BORGES, 2009).

### 3.2 O FUNGO *Histoplasma capsulatum*

*Histoplasma capsulatum* Darling, 1906 é o agente etiológico da histoplasmose e possui em sua primeira descrição taxonômica denominada *Ajellomyces capsulatus* a qual se refere à forma teleomórfica (AJELLO, 1960; SILVA-VERGARA *et al.*, 2001; TIAN; SHEARER, 2002; WOODS, 2002). O Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN) inclui várias disposições especiais para os aspectos de nomenclatura de fungos e após o Simpósio Internacional ocorrido em Amsterdam entre 19 e 20 de Abril de 2011, o qual teve por finalidade abordar a mudança ou não no sistema atual de nomeação de fungos pleomórficos, foi estabelecido que deve se optar pelo nome genérico mais antigo, independentemente da fase que caracteriza, exceto quando o nome mais novo é o mais conhecido, como em casos clínicos, onde o nome escolhido é o que está relacionado com o nome da doença (HAWKSWORTH *et al.*, 2011; TAYLOR, 2011), como no caso de *H. capsulatum*.

Taxonomicamente, *H. capsulatum* é um Eucarioto, pertencente ao reino Fungi, divisão (filo) Ascomycota, subdivisão (subfilo) Pezizomycotina, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, gênero *Histoplasma* e espécie *Histoplasma capsulatum*; sendo que esta apresenta três variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum* (RIPPON, 1990; KERSULYTE *et al.*, 1992; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; DE HOOG *et al.*, 2000; PERROTTA *et al.*, 2001).

O fungo *H. capsulatum* ocorre de forma sapróbia em solos quentes e úmidos em uma fase micelial. Quando inalado, pode formar pequenas células leveduriformes infecciosas dentro do sistema retículo endotelial humano (VEERAVAGU *et al.*, 2013). Trata-se de um fungo dimórfico de difícil isolamento e cultivo *in vitro*, que dependendo dos métodos utilizados e do tempo de cultura pode apresentar variações na sua morfologia, esporulação e habilidade de dimorfismo (LIMA *et al.*, 2001; PERROTTA *et al.*, 2001; SILVA-VERGARA *et al.*, 2001; TIAN; SHEARER, 2002; WOODS, 2002; WOODS *et al.*, 2002; WHEAT, 2006; MUZYKA; EPIFANIO, 2013).

O dimorfismo em *H. capsulatum* está intimamente envolvido com as estratégias de adaptação para a sobrevivência do fungo, que faz deste um patógeno intracelular facultativo quase que exclusivo das células do retículo endotelial de mamíferos (TIAN; SHEARER, 2002; WOODS, 2002). Um grande número de estudos envolvendo biologia molecular e imunologia tem criado uma integração para o avanço no entendimento do dimorfismo em *H. capsulatum* e sua relação com a virulência desta patologia, mostrando que a mudança de temperatura é um gatilho natural para a indução de uma cascata de regulação gênica, que resulta no processo de diferenciação de uma forma multicelular para uma unicelular, ou vice-versa, capaz de facilitar o processo inicial de infecção do hospedeiro (MAGRINI; GOLDMAN, 2001; TIAN; SHEARER, 2001; 2002; WOODS, 2002).

Macroscopicamente, em meios de cultura definidos e em temperatura de 28°C, o fungo *H. capsulatum* apresenta um desenvolvimento filamentoso, cresce como culturas brancas, algodonosas, de desenvolvimento lento e com micélio aéreo, que tendem a escurecer com o tempo (Figura 1A). Em temperatura corpórea (37°C) desenvolve-se de forma leveduriforme, formando colônias cremosas, úmidas, brilhantes e lisas (Figura 1B).

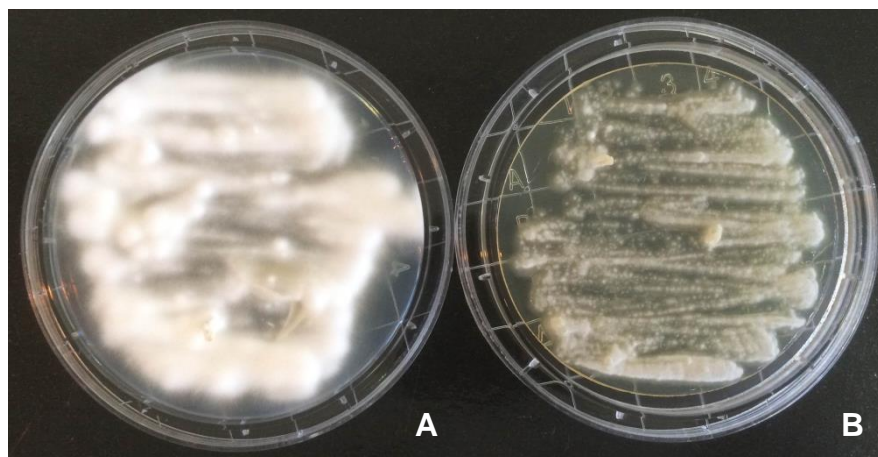


FIGURA 1 - Macromorfologia de isolado de *H. capsulatum* em Ágar Sabouraud (SAB). A – Fase micelial a 28°C; B – Fase leveduriforme a 37°C.  
 FONTE: O AUTOR, 2014.

A cultura fúngica de *H. capsulatum* cultivada em temperatura ambiental, quando observada microscopicamente, apresenta hifas hialinas delicadas, septadas e ramificadas, que produzem as formas infectantes denominadas microconídios ou clamidoconídios, lisas e equinulados, e macroconídios tuberculados (Figura 2). Sob temperaturas corpóreas e em meios ricos, pode-se verificar pequenas células ovaladas leveduriformes medindo de 1 a 5 µm de diâmetro, que são encontradas, quando no tecido do hospedeiro, quase que exclusivamente no interior de macrófagos (MUKHOPADHYAY; KATZENSTEIN, 2010). As células leveduriformes, em meio de cultura, podem apresentar brotamento, o que raramente se observa nos tecidos (MUKHOPADHYAY; DOZTADER, 2013). Microscopicamente são observados microconídios e macroconídios tuberculados. Estes são largos com parede espessa, cobertos por projeções espiculadas, com 7 a 15 µm de diâmetro. Os microconídios são ovais e pequenos, com 2 a 5 µm de diâmetro e se caracterizam por ser a forma infectante do fungo (FERREIRA; BORGES, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011). No hospedeiro ou em meios de cultura a 37°C, *H. capsulatum* exibe-se como pequenas leveduras ovaladas com 3 a 5 µm de diâmetro e podem ser visualizadas no interior de macrófagos, formando uma “falsa cápsula” oriunda de retração citoplasmática (FERREIRA; BORGES, 2009).

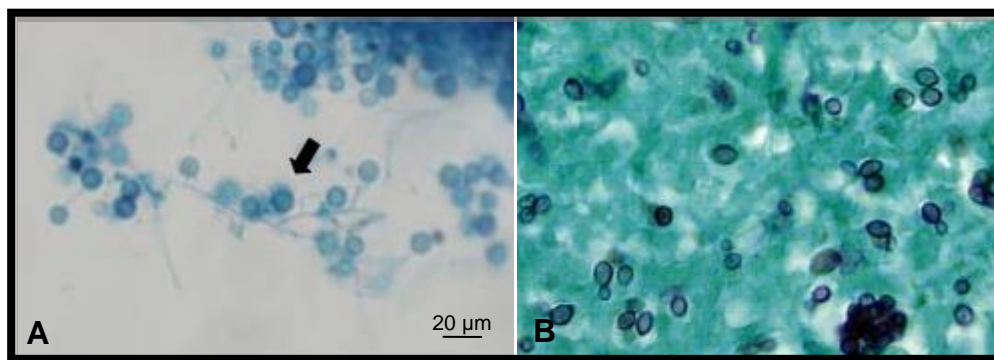


FIGURA 2 - Micromorfologia de isolado de *H. capsulatum* var. *capsulatum*. A – Presença de hifas hialinas, finas e septadas com macroconídios tuberculados característicos (seta). Exame direto com lactofenol azul de algodão da colônia com crescimento micelial. B – Presença de leveduras ovais em biópsia de tecido pulmonar corado com prata metenamina Grocott.  
 FONTE: Adaptado de VAGO, 2012.

Na maior parte das regiões com relatos da doença, a histoplasmose humana é causada por *H. capsulatum* var. *capsulatum*, no entanto, nas regiões oeste e central do continente africano, a espécie *H. capsulatum* var. *duboisii* pode ser encontrada como agente causal da doença (GUARNER; BRANDT, 2011). Além da distribuição geográfica, as três variedades diferenciam também em morfologia, patogenicidade e manifestações clínicas (ALLTON *et al.*, 2010; MUÑOZ *et al.*, 2010). Morfologicamente, *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii* são indistinguíveis em sua fase micelial, no entanto, em tecidos de hospedeiros animais, *H. capsulatum* var. *duboisii* é encontrado em sua fase leveduriforme de forma ovalada, maior e de parede mais espessa do que *H. capsulatum* var. *capsulatum*, medindo de 10 a 15 μm e de localização extracelular no tecido do hospedeiro quando corado pela prata-metanamina (KERSULYTE *et al.*, 1992; PERROTTA *et al.*, 2001; TIAN; SHEARER, 2002).

A variedade *H. capsulatum* var. *duboisii* foi descrita pela primeira vez por Dubois e colaboradores (1952) na região da atual República Democrática do Congo, através de isolamento do patógeno de lesões cutâneas em hospedeiros humanos e é normalmente encontrada no continente africano, enquanto que *H. capsulatum* var. *farciminosum* é endêmico no oeste, norte e nordeste do continente africano, no Oriente Médio, na Índia e no Extremo Oriente (AMENI, 2006) e foi descrito apenas como patógeno de cavalos e mulas (LACAZ *et al.*, 1998; KAUFFMAN, 2007).

### 3.3 EPIDEMIOLOGIA

O agente etiológico da histoplasmose é encontrado em todo o mundo, mas existem grandes diferenças nos níveis de endemicidade (COLOMBO *et al.*, 2011; ASSI *et al.*, 2013; HOLBROOK *et al.*, 2013, NACHER *et al.*, 2014), com particular destaque nos Estados Unidos, principalmente nos vales de Ohio e do rio Mississippi, onde estima-se que cerca de 80% da população pode ter sido exposta a *H. capsulatum* em alguma ocasião (HOLBROOK *et al.*, 2013; VEERAVAGU *et al.*, 2013).

Os aspectos ambientais e ocupacionais, bem como as características dos pacientes foram associados ao aumento do risco de desenvolver a doença e desde a década de 1990 têm sido estudados (NACHER *et al.*, 2011; 2014).

A literatura relata casos de infecção assintomática pós-transplante, a qual ocorre via infecção primária ou infecção secundária, em pacientes com exposição prévia ao agente num momento de imunossupressão; e via reativação de infecção prévia latente. Raros têm sido os casos de transmissão a partir do próprio enxerto (ISON; NALESNIK, 2011; ASSI *et al.*, 2013).

A mortalidade associada à histoplasmose pós-transplante e a apresentação clínica inespecífica enfatiza a importância da triagem e dos exames de rotina antes ou durante o primeiro ano após o transplante, para identificar os casos da doença precocemente, o que talvez possa levar à redução da taxa de mortalidade (HAGE *et al.*, 2010; ASSI *et al.*, 2013).

Em 2008, Julg e colaboradores relataram caso de três pesquisadores que adquiriram histoplasmose após permanecerem aproximadamente por uma hora e meia, a cerca de um metro da entrada da caverna Tamana, situada no grupo de ilhas de Trinidad e Tobago, para observação das espécies de morcegos locais. Os pesquisadores utilizaram apenas luvas e não fizeram uso de proteção por máscara respiratória porque não haveria a necessidade de entrar no abrigo. Esse período de observação dos morcegos saindo da caverna foi suficiente para que os três pesquisadores adquirissem a infecção.

Em 2013, Etxeberria-Lekuona e colaboradores relataram um caso na Espanha, de uma paciente de 38 anos, imunocompetente, moradora de zona rural,

internada com quadro de 2 semanas de evolução de febre, tosse seca, diarreia e vômito. O tratamento foi iniciado com antibiótico de amplo espectro e corticóides. Posteriormente foi realizado um aspirado medular, que mostrou um elevado número de macrófagos com presença de microrganismos intracelulares arredondados e pseudocapsulados. A suspeita de infecção por *H. capsulatum* confirmou-se após a realização de novos testes e de relatos da própria paciente que havia passado 3 semanas na Costa Rica há 12 anos. A paciente foi tratada com anfotericina B durante 3 semanas, seguido de itraconazol durante 12 meses. Os autores não chegaram a uma conclusão sobre a forma de manifestação da histoplasmose nesta paciente, imunocompetente.

No Brasil, a infecção por *H. capsulatum* var. *capsulatum* é considerada relativamente comum, ocorrendo nas cinco grandes regiões de forma endêmica (FAIOLLA *et al.*, 2013; NORKAEW *et al.*, 2013) e tendo sido verificada através de levantamentos epidemiológicos, por meio de testes intradérmicos de histoplasmina (COLOMBO *et al.*, 2011).

Existem relatos de surtos de histoplasmose associados a visitas de grupos turísticos a cavernas habitadas por morcegos. Um grupo de oito turistas japoneses adquiriu a infecção por permanecer durante 2 horas em uma caverna próxima à cidade de Manaus, Brasil (SUZAKI *et al.*, 1995).

Severo e colaboradores (2001) revisaram 137 casos de histoplasmose relatados no estado do Rio Grande do Sul entre 1978 e 1999. Deste total, 66% dos pacientes foi acometido pela forma disseminada da doença, 10% apresentou histoplasmose pulmonar crônica e 24% apresentou a doença em sua forma primária ou síndrome auto-limitada.

Um estudo realizado por Martins e colaboradores (2005) com pacientes da área urbana do Rio de Janeiro e Niterói, mostrou que a presença da histoplasmose pulmonar em áreas urbanas é uma realidade e que pode acometer indivíduos saudáveis, sendo muitas vezes subdiagnosticada devido aos sintomas inespecíficos e a remissão espontânea em muitos casos. A febre e o nódulo pulmonar foram os principais achados clínicos e radiológicos.

O grupo de Benevides (2007) do Serviço de Clínica Médica do Hospital Heliópolis, na cidade de São Paulo, relatou um caso de histoplasmose adrenal bilateral em um homem idoso imunocompetente, morador de área urbana na cidade

de São Paulo, com relatos de que o paciente costumava frequentar áreas de pesca. Os pesquisadores relatam não ser frequente a histoplasmose disseminada acometendo a glândula adrenal, entretanto, ocorre mais em pacientes imunossuprimidos e de forma unilateral.

Em um estudo realizado entre 1996 e 2006 por Prado e colaboradores (2009), verificou-se o crescimento da histoplasmose como causa primária de morte associada ou não com AIDS. Nesse período observaram a histoplasmose como terceira causa de morte entre esses pacientes, em relação às outras micoses sistêmicas. Dados recentes sobre histoplasmose da região amazônica e das Guianas sugerem que esta é uma das principais doenças fúngicas subdiagnosticadas (NACHER *et al.*, 2011; 2014).

Epidemias de histoplasmose aguda têm ocorrido em áreas endêmicas e não endêmicas após exposição a ambientes contaminados com o fungo. Tais surtos já foram observados no Brasil nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso e Minas Gerais (FERREIRA; BORGES, 2009).

Faiolla e colaboradores (2013) realizaram um levantamento de pacientes imunocompetentes diagnosticados com histoplasmose entre 1970 e 2012, em um hospital localizado na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. Dos 123 pacientes analisados, 95 apresentaram a doença ativa, manifestada nas diferentes formas, indicando uma área de endemismo da doença. Pacientes do sexo masculino foram a maioria dos acometidos e a maioria dos pacientes residia em municípios próximos ao estado de Minas Gerais. O uso de tabaco e consumo de álcool eram frequentemente relatados em pacientes com as formas pulmonar crônica e disseminada de histoplasmose.

Além de sua importância clínica, o fungo *H. capsulatum* foi isolado também de animais, como no trabalho de Canteros e colaboradores (2005), onde se relatou o primeiro caso argentino de isolamento a partir do morcego urbano *Eumops bonariensis*, realizado após amostragem com 75 morcegos inicialmente coletados para estudo de vírus da raiva. Os exemplares tiveram fígado e baço utilizados para realização de cultura e as amostras com resultado positivo foram comparadas por meio de PCR com outros isolados clínicos para análise fenotípica.

Dias (2009) através da análise de dados referentes ao período de 2003 a 2008 no estado de São Paulo e por meio de coleta de exemplares, encontrou 3,58%



de positividade para *H. capsulatum* através de isolamento de vísceras e por meio de coleta de fezes em abrigos de morcegos, encontrou apenas 1 amostra com crescimento positivo de *H. capsulatum* entre 61 amostras coletadas.

Allton e colaboradores (2010) analisaram a carga fúngica em morcegos de *H. capsulatum*, por meio de incubação de amostras de urina, soro, pulmão e baço em meio BHI contendo 10% de sangue de carneiro desfibrinado de 40 exemplares frugívoros. Do total de morcegos, 23 apresentaram resultado positivo nas culturas de pulmão ou baço.

Além destes casos de presença do fungo *H. capsulatum* em morcegos, existe um primeiro relato do mesmo em aves, numa fêmea de *Ecletus parrot* de 1 ano e 5 meses, por Quist e colaboradores (2011) e em um macho de coelho miniatura doméstico da espécie *Oryctologus cuniculus* de 2 anos e 5 meses, por Brandão e colaboradores (2014).

### 3.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A histoplasmose ocorre através da inalação de microconídios da fase miceliana do fungo *H. capsulatum*, que ao chegarem aos alvéolos pulmonares, diferenciam-se em leveduras e são fagocitadas por macrófagos. As leveduras proliferam dentro dos fagolisossomos até a ruptura da célula hospedeira e liberação das mesmas, sendo subsequentemente absorvidas pelos fagócitos vizinhos. Tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes são suscetíveis à infecção, mas na maioria dos casos, os hospedeiros imunocompetentes são capazes de controlar o crescimento de fungos com a ativação da resposta imune adaptativa, o que aumenta a resposta antifúngica de fagócitos (KROETZ; DEEPE, 2012, HOLBROOK *et al.*, 2013).

O parasitismo de *H. capsulatum* no fagolisossomo é uma estratégia de sobrevivência intracelular. No organismo do hospedeiro, conídios ou leveduras são imediatamente envolvidos pelo fagossoma. Embora muitos patógenos intracelulares possam manipular as células hospedeiras, o mecanismo que influencia o resultado da infecção por *H. capsulatum* não inibe a fusão do fagossoma com o lisossoma,

isto é, o fagolisossoma (HOLBROOK *et al.*, 2013). Assim, o fungo é exposto a uma grande quantidade de produtos oxidantes e enzimas degradativas provenientes do macrófago, que constituem as defesas do hospedeiro e que leva à expressão de genes reguladores e mudanças estruturais e adaptativas no fungo (WOLF *et al.*, 1987; SCHNUR; NEWMAN, 1990).

Em indivíduos imunossuprimidos, as leveduras de *H. capsulatum* disseminam-se para vários órgãos através de fagócitos, onde podem sobreviver pela falta de ativação celular por uma resposta imune pró-inflamatória robusta (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006; NACHER *et al.*, 2014).

Em hospedeiros imunocompetentes, no entanto, os macrófagos adquirem atividade fungicida e acabam por controlar a infecção. O processo da doença em pacientes imunocompetentes é geralmente limitado a um nódulo solitário na radiografia, mas linfonodos hilares ou mediastinais aumentados também podem ser observados (CHONG *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2013).

As células T contribuem na resposta imune protetora via liberação de citocinas que ativam os macrófagos, principais células efectoras que restringem o crescimento intracelular do organismo. Entretanto, é complexo o papel dos macrófagos no processo de defesa do organismo à histoplasmose, porque mesmo participando da imunidade, estas células promovem um ambiente propício e protetor, em que o patógeno acaba sobrevivendo e se replicando (NOSANCHUK; GACSER, 2008).

O possível envolvimento do dimorfismo com a patogênese de *H. capsulatum* pode ter ligação, em particular, no que se diz respeito a mudanças no meio em que o mesmo se encontra, não somente relacionadas à temperatura, mas principalmente à ela e ao provável papel de genes reguladores fase-específicos, cuja expressão e repressão estão diretamente ligados à presença de metabólitos essenciais, cálcio (PATEL *et al.*, 1998) e ferro (TIMMERMAN; WOODS, 2001).

Vários fatores de risco são associados ao início da disseminação de *H. capsulatum*, especialmente aqueles em que existe algum mecanismo de imunossupressão envolvido como em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), indivíduos transplantados ou com malignidades hematológicas e em indivíduos sob uso de corticosteróides (HAGE *et al.*, 2010; GUARNER; BRANDT, 2011; NEGRONI, 2011).

### 3.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença tem sido estabelecido pela combinação de exames clínico, radiológico, epidemiológico e laboratorial (microbiológico e imunológico), considerando-se ainda a positividade na cultura após conversão à fase leveduriforme, como sendo o padrão ouro (MUÑOZ *et al.*, 2010; BRAZÃO-SILVA *et al.*, 2013; MUKHOPADHYAY; DOXTADER, 2013). Segundo Wheat e Kauffman (2003), a sensibilidade de cada método varia com o tipo clínico de histoplasmose (Quadro 1).

Teste	Disseminada	Pulmonar crônica	Autolimitada
Sorologia	71	100	98
Microbiologia	85	85	15
Histopatologia	43	17	9
Imunologia	92	21	39

QUADRO 1 – Sensibilidade e especificidade dos testes laboratoriais para histoplasmose (em % de verdadeiros-positivos).

FONTE: Adaptado de WHEAT; KAUFFMAN, 2003.

A inclusão de um diagnóstico laboratorial diferencial é necessária, pois a histoplasmose pode se assemelhar clinicamente e histopatologicamente à tuberculose, sífilis, paracoccidioidomicose e leishmaniose (CALZA *et al.*, 2003; AKIN; HERFORD; CICCÌÙ, 2011; BRAZÃO-SILVA *et al.*, 2011; 2012; GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2012). Lesões orais quando ulcerativas, nodulares ou vegetativas, por exemplo, podem assemelhar-se a qualquer doença granulomatosa (AKIN *et al.*, 2011).

O diagnóstico laboratorial da histoplasmose baseia-se em encontrar o fungo em fluidos orgânicos ou tecidos (histopatologia) através da análise direta ou da cultura de materiais biológicos e/ou detecção de anticorpos através de testes sorológicos. Uma das ferramentas utilizadas no diagnóstico micológico da histoplasmose é o exame direto. A observação da presença de células leveduriformes de *H. capsulatum* em urina, escarro, lavado brônquico, líquor, medula

óssea e biópsias, através da microscopia de preparações a fresco é muito imprecisa (ROSSINI; GOULART, 2006).

Métodos de coloração como Wright, Giemsa e Grocott mostram melhores resultados. Outro fator limitante do exame direto a fresco ou corado é o tamanho reduzido de *H. capsulatum* e sua similaridade com outros agentes causadores de micoses e outras parasitoses. Deste modo, torna-se essencial a identificação do fungo através de seu isolamento e cultivo para o diagnóstico definitivo da histoplasmose (ROSSINI; GOULART, 2006; KAUFFMAN, 2007; GUARNER; BRANDT, 2011).

O diagnóstico microbiológico clássico para histoplasmose é baseado no isolamento do microrganismo em culturas a partir de tecidos, sangue ou fluidos corporais (escarro, sangue, líquido) (KAUFFMAN, 2007; BUITRAGO *et al.*, 2013). No entanto, o crescimento das culturas é relativamente lento, podendo levar até 4 semanas para que o fungo seja visualizado, exigem-se instalações laboratoriais nível 3 para sua manipulação, pelo alto risco de contaminação no manuseio da colônia após a conversão da forma micelial do fungo para a fase leveduriforme patogênica (WHEAT, 2009; EBENYE, 2012; ARANGO-BUSTAMANTE *et al.*, 2013; BUITRAGO *et al.*, 2013).

O cultivo de amostras biológicas provenientes de pacientes com suspeita de histoplasmose é realizado em meios de isolamento como Ágar Sabouraud (SAB) e Mycosel (MYC), com incubação a 28°C durante 4 a 12 semanas (RIPPON, 1988). Nestas condições são observados dois tipos de conídios durante o desenvolvimento micelial, o macroconídio tuberculado, medindo em torno de 8 µm a 15 µm de diâmetro e microconídios de 2 µm a 4 µm com parede lisa. A confirmação da identificação do fungo requer a conversão à fase leveduriforme por meio de incubação a 37°C (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991). Quando convertidos à fase leveduriforme, observam-se colônias glabras, lisas, branco-amareladas em que na microscopia evidenciam-se leveduras ovais de 3 µm a 5 µm, unibrotantes (LACAZ *et al.*, 2002; KAUFFMAN, 2007).

A sensibilidade das técnicas de cultura pode ser afetada pela fonte, adequação e número de amostras enviadas ao laboratório de microbiologia (KAUFFMAN, 2007; WHEAT, 2009; CATANIA *et al.*, 2013).

A histoplasmose é uma doença granulomatosa e o diagnóstico histopatológico pode ser feito quando células leveduriformes são vistas parasitando macrófagos em cortes teciduais corados por hematoxilina-eosina (HE). As leveduras são observadas como corpúsculos levemente basofílicos, esféricos, rodeados por um halo claro delimitado por uma parede celular fina e hialina (RIPPON, 1988; ROSSINI; GOULART, 2006).

Embora exames histopatológicos possam fornecer dados para um diagnóstico rápido, sua sensibilidade é baixa (menos de 50%) em pacientes com a doença na forma disseminada e ainda menor naqueles com histoplasmose pulmonar (Quadro 1) (WHEAT, 2006; ELÍAS *et al.*, 2012).

O diagnóstico diferencial de *H. capsulatum* pode ser feito através de observação em cortes de tecido para: *Blastomyces dermatitidis* (devido à presença de brotamento de base ampla, onde a busca de formas maiores pode ser útil no diagnóstico); *Cryptococcus neoformans* (a variação de tamanho e a procura por leveduras para coloração de Mucicarmine pode auxiliar no diagnóstico); endósporos de *Coccidioides* spp. (a procura por restos de esférulas rompidas ou esférulas intactas é fundamental para o diagnóstico); *Penicillium marneffei* (apresenta formação de um septo transversal ao invés de brotamento) e *Candida glabrata* (pode apresentar mais variabilidade no tamanho do que *Histoplasma capsulatum* e a inflamação principalmente de neutrófilos) (BUENO-FISCHER *et al.*, 2009; GUARNER; BRANDT, 2011).

Além disso, vários protozoários intracelulares também podem se mostrar similares a *H. capsulatum*, incluindo os agentes da leishmaniose, toxoplasmose e doença de chagas (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009). A diferença entre estes organismos e *H. capsulatum* no diagnóstico histopatológico é que quando corados com hematoxilina-eosina, todo o protozoário é corado e não apresenta o halo que é produzido pela parede da célula fúngica e geralmente, o quadro clínico irá separar a histoplasmose das demais doenças (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009; ELÍAS *et al.*, 2012).

As técnicas sorológicas são fundamentais para o diagnóstico da histoplasmose, uma vez que o procedimento de isolamento é demorado e às vezes apresenta baixa sensibilidade. Atualmente, vários ensaios sorológicos vêm sendo utilizados para detectar anticorpos específicos contra o fungo. Historicamente, a

identificação de anticorpos circulantes contra *H. capsulatum* em soro humano tem se mostrado importante no diagnóstico confirmatório, bem como no prognóstico da doença (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006; ZHANG; GIBSON JUNIOR; DALY, 2013).

Testes para detecção de anticorpos são mais úteis em pacientes com histoplasmose na forma crônica, em que o indivíduo já desenvolveu anticorpos suficientes para detecção, mas são menos sensíveis e devem ser interpretados com cautela, uma vez que os níveis de anticorpos podem manter-se elevados por anos após a infecção aguda por *H. capsulatum* (KAUFFMAN, 2007). Portanto, uma sorologia positiva nem sempre indica atividade de doença. Reações cruzadas podem ocorrer com outras micoses (PASSONI *et al.*, 2003).

Uma das técnicas mais utilizadas para detecção destes anticorpos é a imunodifusão, com sensibilidade de 70 a 100%, dependendo da forma clínica. Trata-se de uma técnica de precipitação num gel de agarose sobre uma lâmina de vidro, onde antígeno e anticorpo se difundem um em direção ao outro, formando linhas de precipitação (ANJOS *et al.*, 2007).

Normalmente, mesmo com a formação imediata de anticorpos em pacientes imunocompetentes, a detecção dos mesmos pode levar um tempo, inviabilizando o uso de técnicas como imunodifusão para diagnóstico de confirmação da doença em indivíduos na fase mais aguda de histoplasmose ou em pacientes imunossuprimidos, cuja resposta imune é deficiente (KAUFFMAN, 2007).

Para o diagnóstico de histoplasmose disseminada, a detecção de antígeno de *H. capsulatum* em soro ou urina é amplamente utilizada por tratar-se de um método rápido (SRINIVASAN *et al.*, 2009). A pesquisa de antígenos pode ser negativa em pacientes com manifestações clínicas leves ou com doença extrapulmonar localizada. Reações cruzadas podem ocorrer com paracoccidiodomicose, blastomicose e peniciliose (ESCOBAR *et al.*, 2014).

Além de ser de realização rápida, o método é útil para o acompanhamento dos pacientes, uma vez que os níveis de antígenos declinam em resposta ao tratamento e voltam a subir em casos de recaída (WHEAT; KAUFFMAN, 2003). A sensibilidade do método é maior em casos de pacientes com a forma disseminada da doença (WILLIAMS *et al.*, 1994).

Em pacientes imunossuprimidos com histoplasmose, especialmente aqueles portadores do vírus HIV, as técnicas sorológicas são significativamente limitadas, uma vez que a sorologia chega a ser negativa em até 50% dos casos (WHEAT *et al.*, 2002; GANGAT, 2005). No entanto, erros falso-positivos podem ocorrer em pacientes com blastomicose ou paracoccidioidomicose, por exemplo (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006; KAUFFMAN, 2007).

Diante deste panorama, técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para um diagnóstico mais rápido e preciso da histoplasmose e como ferramentas importantes para a compreensão da epidemiologia dessa doença, tanto na determinação de novas zonas endêmicas como na relação do hospedeiro com as fontes de infecção (TAYLOR *et al.*, 2000). Estas técnicas visam a detecção do DNA de *H. capsulatum* em amostras clínicas (DANTAS *et al.*, 2013) e têm permitido realizar análises evolutivas, estudos de diversidade genética e diversos outros estudos de epidemiologia molecular (MUÑOZ *et al.*, 2010). O DNA ribossomal (DNAr) vem sendo utilizado para esta finalidade por possuir múltiplas cópias gênicas, o que acarreta grande sensibilidade aos ensaios (BUIRAGO *et al.*, 2006; 2013).

Entre os métodos de tipificação, Gaur e colaboradores (1981) introduziram isoenzimas com o propósito de analisar as variações em isolados de solo obtidos de quatro áreas nos EUA em que foi observada diversidade fenotípica entre as cepas de *H. capsulatum* estudadas.

White e colaboradores (1990) descreveram que a unidade de DNA ribossomal nuclear consiste em uma série repetitiva de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 26S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS) (Figura 3). A região ITS, localizada entre o 18S e 26S inclui dois espaços (ITS1 e ITS2), separados por uma região conservada, a 5.8S. Diferenças interespecíficas na sequência do ITS1 e ITS2 têm sido utilizadas para detectar e identificar espécies de fungos (WANG *et al.*, 2005) e também apresentam maior probabilidade de identificação bem sucedida de uma ampla gama de fungos, se tal região for utilizada como barcode universal para fungos (SCHOCH *et al.*, 2012).

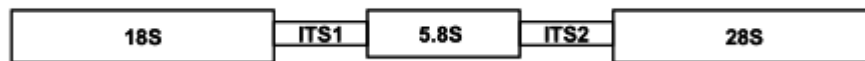


FIGURA 3 - Regiões espaçadoras intergênicas ITS 1 e ITS 2 do DNAr.  
FONTE: WANG *et al.*, 2005.

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada no diagnóstico da histoplasmose em amostras clínicas, por ter como características altos níveis de sensibilidade e especificidade (MUÑOZ *et al.*, 2010). A partir desta, outras técnicas como PCR-RT (*real-time PCR-based*) e o RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) foram frequentemente empregadas nas análises do DNA de *H. capsulatum* (BUITRAGO *et al.*, 2006; GUIOT *et al.*, 2007).

Avanços na tecnologia de PCR resultaram em métodos que fornecem resultados rápidos (RICKERTS *et al.*, 2002). A primeira proposição da PCR para diagnóstico de histoplasmose foi realizada pelo grupo de Bialek. Eles relataram, em 2002, um método utilizando dois ensaios de PCR que permitiram a detecção de DNA de *H. capsulatum* em 100 tecidos embebidos em parafina e fixados em formalina humanos. O primeiro destes ensaios utilizou um *primer* iniciador específico que codificava para Hcp100 específica, descrito por Porta e colaboradores (1999).

Um protocolo para *seminested* PCR foi testado em amostras humanas, principalmente de sangue e biópsias (BRACCA *et al.*, 2003) e mostrou resultados interessantes, porém os autores relataram a necessidade de testes em larga escala, para provar sua eficácia na rotina de diagnósticos.

Ensaio de PCR em tempo real usando a região ITS1 do DNAr como alvo têm sido utilizados e obtiveram sensibilidade de 100% relatado em dois estudos diferentes, embora o número de amostras clínicas de *H. capsulatum* utilizadas tenha sido muito baixo (BUITRAGO *et al.*, 2006; 2013).

Simon e colaboradores (2010) avaliaram 341 amostras enviadas para diagnóstico de histoplasmose e relataram sensibilidade de 95,4% utilizando um protocolo de PCR em tempo real e 96% de sensibilidade utilizando a plataforma TaqMan (Roche).



No estudo da comparação de diferentes protocolos para a detecção de DNA de *H. capsulatum* por PCR, tem-se mostrado que a sensibilidade do ensaio depende da seleção da região alvo e do método de amplificação (BUIRAGO *et al.*, 2012).

Comparando-se os diferentes protocolos para PCR, os mais sensíveis e específicos para detecção de *H. capsulatum* foram baseados na amplificação da região ITS por PCR-RT (BUIRAGO *et al.*, 2006) e os menos sensíveis foram baseados na amplificação de genes por PCR convencional (FRIAS *et al.*, 2012).

De acordo com Buitrago e colaboradores (2006), a PCR-RT utilizando sequências hipervariadas do DNA se mostrou mais sensível no diagnóstico da histoplasmose quando comparado com métodos convencionais, como os sorológicos e os de cultivo. Gago e colaboradores (2014) desenvolveram PCR Multiplex em tempo real através de sondas moleculares para a detecção simultânea de três dos agentes causadores mais frequentes de infecção oportunista por fungos em pacientes imunocomprometidos: *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans/gattii*, o qual mostrou uma elevada especificidade (100%) e reprodutibilidade da técnica.

A PCR-Multiplex é outra técnica molecular utilizada na detecção de *H. capsulatum*, pois permite a amplificação simultânea de mais de uma sequência alvo por reação, pela mistura de vários pares de iniciadores (ELÍAS; CUESTAS; SANDOVAL, 2012). Elías e colaboradores (2012) desenvolveram dois pares de iniciadores para PCR-multiplex, um dos quais, específico para o *H. capsulatum* (Hcl e HclI) e outro, universal para fungos (ITS1 e ITS4). Quando utilizados em conjunto, mostraram 100% de especificidade na identificação de *H. capsulatum* em amostras clínicas.

Recentemente, Scheel e colaboradores (2014) desenvolveram uma metodologia de amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) desenhada para amplificar o locus Hcp100 de *H. capsulatum*, com a finalidade de facilitar o diagnóstico molecular da doença. Este locus integra um gene super expressado durante a invasão dos macrófagos. Tal gene não é propenso a falsa hibridização, que pode levar a reações cruzada. Os autores relatam que a técnica foi 100% sensível e específica, quando testado com o DNA extraído a partir de cultura dos isolados.

### 3.5.1 Amplificação em círculo rolante (RCA)

A metodologia de amplificação em círculo rolante (RCA) foi desenvolvida em 1989, usando-se várias polimerases e DNA circular de diferentes modelos, representando um poderoso processo de amplificação de sinal e detecção de sequências alvo de ácido nucleico, incluindo polimorfismos de nucleotídeos que se diferenciam apenas por alguns pares de base, podendo servir como uma plataforma universal para diagnóstico *in vitro* de uma variedade de biomarcadores, com base em qualquer sequência de ácido nucleico (FIRE; XU, 1995).

É um método isotérmico de síntese de hibridização enzimática por DNA polimerases que resulta em centenas de bilhões de pequenas cópias lineares únicas, de sondas de DNA circular. Esta reação é iniciada pela hibridação de uma fita de DNA linear simples para um mini círculo de DNA específico. Assim, obtêm-se repetidas sequências de DNA que podem servir como um amplificador de sinal para detecção de determinados ácidos nucleicos e outras moléculas biologicamente importantes em diagnósticos de genômica e proteômica (NAJAFZADEH *et al.*, 2011).

Dependendo do objetivo e/ou da molécula alvo a ser detectada, a técnica RCA é realizada utilizando uma variedade de protocolos e formatos de testes com ramificações cinéticas lineares ou exponenciais. Devido à sua robustez e simplicidade, os ensaios baseados em RCA têm uma posição distinta na área de diagnóstico molecular, entre outras técnicas de amplificação de temperatura única (NAJAFZADEH *et al.*, 2011).

Em sua formulação original, a reação envolve inúmeras voltas de síntese enzimática isotérmica, em que cada DNA polimerase estende um *primer* hibridizado em círculo, progredindo continuamente a volta da sonda de DNA circular em várias dezenas de nucleotídeos para replicar a sua sequência. Este processo é caracterizado por uma cinética linear, de fácil cultivo, onde milhares de sequências complementares se repetem de um mini círculo do DNA original. Estes produtos de amplificação geralmente exibem uma larga distribuição contínua ao longo do comprimento e são normalmente vistas em imagens de gel de eletroforese como manchas largas de DNA de alto peso molecular.

A alta sensibilidade da técnica torna possível quantificar com precisão e confiabilidade o número de cópias do gene, bem como detectar genes de cópia única, complexos discretos antígeno-anticorpo e níveis de expressão de RNAm em células individuais (ZHOU *et al.*, 2008).

A amplificação em círculo rolante (RCA) foi proposta nos anos 90 (FIRE; XU, 1995) e é uma técnica isotermal de amplificação de DNA sensível, específica e reprodutível, para identificação molecular rápida de microrganismos (NAJAFZADEH *et al.*, 2011). Os diagnósticos baseados em RCA são caracterizados por sua boa reprodutibilidade e com menos erros de amplificação comparados a PCR (DEMIDOV, 2002). Esta técnica permite a detecção de uma única alteração nucleotídica e previne uma amplificação não específica, um fator de risco comum na PCR convencional. Desta forma, a amplificação pela técnica RCA é particularmente útil para discriminar espécies proximamente relacionadas ou genótipos dentro da mesma espécie (SUN *et al.*, 2011).

Vergnaud e colaboradores (1991) utilizaram sondas cadeado para identificação de polimorfismos do DNA humano e seus resultados confirmaram a alta especificidade da sonda, além da rapidez do diagnóstico.

Nilsson e colaboradores (1994) foram os primeiros a desenvolver e utilizar sondas de oligonucleotídeos para a detecção localizada de ácidos nucleicos específicos, para aplicação em amplificação em círculo rolante (RCA).

#### 3.5.1.1 Sonda cadeado baseada na técnica de RCA

A sonda cadeado é um oligonucleotídeo circularizável que consiste de dois segmentos complementares terminais à região 3' e 5' da sequência alvo, através de uma região genética vinculadora (Figura 4). Quando as regiões terminais 3' e 5' dos oligonucleotídeos da sonda são justapostas à sequência de interesse, os finais da sonda podem ser ligados pela ação de uma DNA ligase, para formar uma molécula de DNA circular a ser amplificada por RCA (NILSSON *et al.*, 1994).

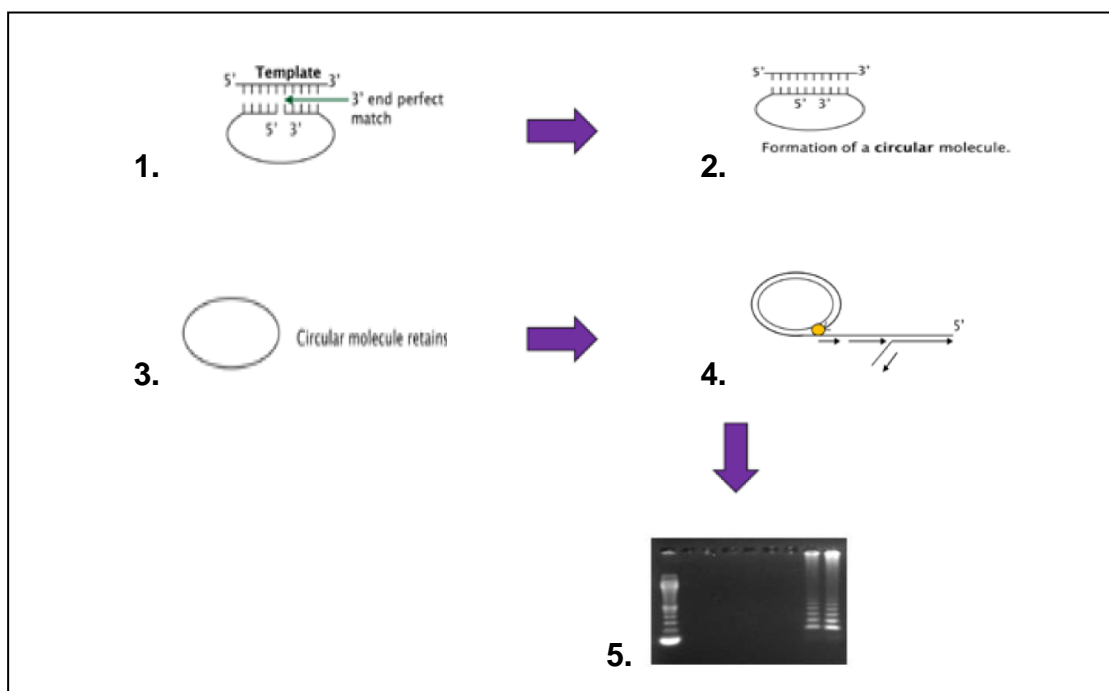


FIGURA 4 – Exemplo da aplicação de sondas cadeado associadas à técnica de RCA. 1 - Hibridização da sonda cadeado; 2 - Ligação da sonda cadeado à sequência alvo; 3 - Tratamento do produto de ligação com Exonucleases I e III; 4 - Reação de amplificação em círculo rolante (RCA) na presença de dois *primers*; 5 - Detecção do produto de amplificação em círculo rolante (RCA) através de eletroforese em gel de agarose.

FONTE: Adaptado de TSUI *et al.*, 2011.

As sondas cadeado apresentam estabilidade de ligação garantida por estabilizações topológicas, aumentando o rigor da hibridização e permitindo que diferenciem de forma mais eficiente sequências de base única variantes. O resultado é uma ligação altamente localizada, específica e uma amplificação de sinal retida a informação posicional (DEMIDOV, 2002).

Nilsson e colaboradores (1994) demonstraram pela primeira vez a utilização de sondas cadeado para detectar sequências específicas de DNA. Fire e Xu (1995) demonstraram que estas sondas associadas à técnica de RCA eram capazes de produzir inúmeras cópias da sequência alvo de DNA de maneira rápida e simples. A utilização de sondas cadeado aliadas à técnica de amplificação em círculo rolante (RCA) tem se mostrado uma técnica rápida e precisa, pela alta confiabilidade dos resultados (SUN *et al.*, 2011). Após estes trabalhos, a utilização de sondas cadeado

associadas à técnica de RCA para identificação de fungos de interesse clínico tem sido amplamente relatada (LIZARD *et al.*, 1998; THOMAS *et al.*, 1999; DEAN *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2008; NAJAFZADEH *et al.*, 2011; 2013; DAVARI *et al.*, 2012; ; LACKNER *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2013; HAMZEHEI *et al.*, 2013).

Diferentes estudos relataram o uso de sondas cadeado baseado na técnica de RCA para identificação de outros microrganismos, como *Fusarium graminearum* (DAVARI *et al.*, 2012), *Exophiala* sp. (NAJAFZADEH *et al.*, 2013), *Cladophialophora* sp. (HAMZEHEI *et al.*, 2013), *Candida* sp., *Aspergillus* sp. e *Scedosporium* sp. (ZHOU *et al.*, 2008), *Cyphellophora* sp. (FENG *et al.*, 2013) e *Pseudallescheria* sp. (LACKNER *et al.*, 2012). Porém, ainda não foram encontrados relatos de aplicação da técnica para identificação de *H. capsulatum*.

Na maioria dos casos, a região ITS do DNA é utilizada para identificação de fungos patogênicos (LIZARD *et al.*, 1998; THOMAS *et al.*, 1999; DEAN *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2008; NAJAFZADEH *et al.*, 2011; 2013; SUN *et al.*, 2011; DAVARI *et al.*, 2012; LACKNER *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2013; HAMZEHEI *et al.*, 2013), entretanto, diferentes genes podem ser utilizadas para desenho de sondas cadeado (LIZARD *et al.*, 1998; THOMAS *et al.*, 1999; DEAN *et al.*, 2001; ZOU *et al.*, 2012), como o fator de alongação-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) (DAVARI *et al.*, 2012) e  $\beta$ -tubulina (NAJAFZADEH *et al.*, 2011).

Nilsson e colaboradores (1994) investigaram a capacidade de sondas cadeado em distinguir entre uma sequência de DNA normal e outra mutante em clones de plasmídeos imobilizados em membranas de nylon, através do reconhecimento de uma região alvo denominada M13. Os resultados mostraram que a sonda cadeado só hibridizou em sequências de DNA normal e não com as variantes do gene, demonstrando uma alternativa para facilitar o rastreamento de mutações de DNA.

O uso de sondas cadeado aliado à técnica de RCA também tem auxiliado significativamente no diagnóstico de diferentes tipos de micoses e tem sido relatado por sua boa reprodutibilidade e sensibilidade (LACKNER *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2013; HAMZEHEI *et al.*, 2013; NAJAFZADEH *et al.*, 2013).

Para a identificação de fungos do gênero *Cryptococcus* de amostras clínicas, Kaocharoen e colaboradores (2008), fizeram uso de sondas cadeado, as quais

apresentaram resultados positivos para o patógeno. As mesmas 99 amostras foram realizadas em PCR *fingerprinting*, ou métodos de sorotipagem convencional, sendo que algumas amostras apresentaram resultados negativos.

A utilização de sondas cadeado através da técnica de RCA foi a primeira metodologia molecular capaz de distinguir espécies de *Trichophyton* de outros gêneros de dermatófitos (KONG *et al.*, 2008), demonstrando a necessidade de desenvolver a confiança em ferramentas moleculares para delimitação das espécies de importância em saúde pública.

Em estudo realizado por Sun e colaboradores (2011) propôs-se a utilização da sonda cadeado para a identificação do fungo patogênico *Penicillium marneffe*. Dentre três sondas desenhadas, os autores encontraram uma específica para a espécie de interesse, descartando as outras duas, por apresentarem reação cruzada com outras espécies, mostrando assim, ser possível estabelecer o uso da técnica de RCA de maneira eficiente e com alta sensibilidade para o patógeno em questão.

Em outro estudo realizado utilizando sondas cadeado, Najafzadeh e colaboradores (2011), propuseram através do uso da região ITS de 103 isolados de *Fonsecaea*, o desenho de sondas cadeado (duas para cada espécie), as quais foram testadas com isolados de *Fonsecaea pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*. Foi encontrada uma sonda específica para cada espécie, capaz de amplificar com sucesso a sequência de DNA alvo, não sendo observadas reações cruzadas durante o processo.

Recentemente, Najafzadeh e colaboradores (2013) utilizando de sequências da região ITS alinhadas do DNAr de cinco espécies de *Exophiala* (*E. dermatidis*, *E. oligosperma*, *E. spinifera*, *E. xenobiotica* e *E. jeanselmei*), desenvolveram sondas cadeado específicas para aplicação na detecção do nucleotídeo único no complexo *Exophiala*. O método permitiu a amplificação do DNA alvo a nível de espécie com alta sensibilidade, sem observação de reações cruzadas.

As sondas cadeado aliadas à técnica de RCA têm auxiliado expressivamente no diagnóstico de diferentes patógenos, sendo que seu uso tem sido relatado tanto pela boa reprodutibilidade e sensibilidade quanto pela simplicidade e rapidez no diagnóstico (WANG *et al.*, 2005; LACKNER *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2013; HAMZEHEI *et al.*, 2013; NAJAFZADEH *et al.*, 2013).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

No presente trabalho foram utilizadas amostras de DNA de 29 isolados de *H. capsulatum* (15 de imunocompetentes e 14 de portadores de AIDS) obtidos de pacientes com histoplasmose, procedentes dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná e Rio Grande do Sul e amostras de DNA de 6 fungos utilizados como controles negativos (*Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Scedosporium* sp. e *Trichophyton* sp.), além de uma amostra de *Leishmania brasiliensis*, armazenados a - 20°C no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, localizado no Setor de Ciências Biológicas da UFPR (Quadro 2).

### 4.2 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

A extração do DNA total realizada anteriormente por IMANO, 2005 foi baseada na metodologia estabelecida por VICENTE (2000), onde cerca de 1 cm<sup>2</sup> de micélio da cultura após 5 dias de crescimento em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SAB) foi transferido para um microtubo de volume 1,5 mL, contendo 300 µL de tampão CTAB e uma mistura de sílica em pó (sílica gel/celite 2:1). O material foi triturado manualmente com auxílio de bastões de vidro por 5 minutos, a fim de se obter uma massa cremosa e homogênea.

Em seguida, foi acrescentado mais 200 µL de CTAB e após homogeneização o material foi incubado em banho-maria à 65°C por 10 minutos. Na sequência, foi adicionado um volume de 500 µL de clorofórmio com subsequente centrifugação por 7 minutos a 16000 g. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde dois volumes de etanol 96% gelado foram adicionados, para precipitação do DNA a -20°C.

Após a precipitação do DNA, procedeu-se uma centrifugação a 16000 g por 7 minutos, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 500 µL de etanol 70% a temperatura ambiente e centrifugou-se novamente a 16000 g por 7 minutos.

QUADRO 2– CÓDIGO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Histoplasma capsulatum* ESTUDADOS.

CÓDIGO			HOSPEDEIRO		
N*	AMOSTRA DE DNA	ISOLADO	IMUNOLOGIA	COLETA DA AMOSTRA	PROCEDÊNCIA
1	(05) <sup>(a)</sup>	Hca 24	Imunocompetente	Líquor	PR
2	(06) <sup>(a)</sup>	Hca 25 I	HIV soropositivo	Medula	PR
3	(08) <sup>(d)</sup>	Hc 19	HIV soropositivo	Pústula de mão	SP
4	(09) <sup>(d)</sup>	Hc 20	HIV soropositivo	Biópsia de medula óssea	SP
5	(10) <sup>(d)</sup>	Hc 21	Imunocompetente	Biópsia de pele	SP
6	(11) <sup>(e)</sup>	Hc 49	HIV soropositivo	Lavado brônquico	RJ
7	(12) <sup>(b)</sup>	Hc 55	HIV soropositivo	Medula	ES
8	(13) <sup>(b)</sup>	Hc 56	HIV soropositivo	Medula	ES
9	(14) <sup>(b)</sup>	Hc 59	HIV soropositivo	Medula	ES
10	(15) <sup>(b)</sup>	Hc 61	HIV soropositivo	Medula	ES
11	(18) <sup>(e)</sup>	Hc 212	Imunocompetente	Líquor	RJ
12	(19) <sup>(b)</sup>	Hc 249	HIV soropositivo	Medula óssea	ES
13	(20) <sup>(b)</sup>	Hc 250	Imunocompetente	Pulmão	ES
14	(21) <sup>(e)</sup>	Hc 268	Imunocompetente	Líquor	RJ
15	(22) <sup>(e)</sup>	Hc 340	HIV soropositivo	Líquor	RJ
16	(23) <sup>(e)</sup>	Hc 361	Imunocompetente	Raspado de lesão	RJ
17	(24) <sup>(e)</sup>	Hc 406	Imunocompetente	Líquor	RJ
18	(25) <sup>(e)</sup>	Hc 584	HIV soropositivo	Sangue	RJ
19	(26) <sup>(e)</sup>	Hc 712	HIV soropositivo	Pneumopatia	RJ
20	(27) <sup>(c)</sup>	Hc 713	Imunocompetente	Pulmão	SP
21	(28) <sup>(c)</sup>	Hc 774	Imunocompetente	Pulmão	SP
22	(30) <sup>(e)</sup>	6406	Imunocompetente	Desconhecido	RJ
23	(32) <sup>(d)</sup>	HcEPM	Imunocompetente	Pulmão	SP
24	(33) <sup>(b)</sup>	Hc Alex	Imunocompetente	Pulmão	ES
25	(34) <sup>(e)</sup>	Chesc	Imunocompetente	Desconhecido	RJ
26	(35) <sup>(b)</sup>	Hc R.P.	Imunocompetente	Desconhecido	ES
27	(03) <sup>(a)</sup>	Hca 20	Imunocompetente	Medula óssea	PR
28	(A) <sup>(f)</sup>	Hc CMO	HIV soropositivo	Desconhecido	RS
29	(C) <sup>(f)</sup>	HC 43908	HIV soropositivo	Desconhecido	RS

\* Isolados cedidos por: <sup>(a)</sup> Dr. Flávio Queiroz Telles - Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR; <sup>(b)</sup> Dr. Gercyr Baptista - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória - ES; <sup>(c)</sup> Dr<sup>a</sup>. Claudia Maffei - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP; <sup>(d)</sup> Dr<sup>a</sup>. Olga F. Gompertz - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo - SP; <sup>(e)</sup> Dr<sup>a</sup>. Rosely M. Zancopé-Oliveira - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro - RJ; <sup>(f)</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Lucia Scroferneker - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.



Os microtubos foram vertidos até a secagem completa do precipitado em local protegido. O DNA foi ressuspenso adicionando-se um volume de 100 µL de água ultrapura esterilizada e então acondicionado a -20°C.

#### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL

O DNA obtido foi quantificado através do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (260 nm) e a sua integridade verificada através de eletroforese por 1 hora a 5 V/cm em gel de agarose a 0,8%, utilizando-se um volume de 2 µL de DNA para 1,3 µL de tampão contendo GelRed. Após a quantificação, cada amostra foi diluída em água ultrapura esterilizada a uma concentração final de 50 ng/µL.

#### 4.4 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ITS DO DNAr

Para a amplificação das regiões ITS foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') e LS266 (5'-GCATTCCCAAACAACCTCGACTC-3') (DE HOOG; GERRITS VAN DEN ENDE, 1998). As reações de amplificação foram preparadas num volume de 12,5 µL cada, contendo 5,75 µL de água ultrapura esterilizada; 1,3 µL de tampão de PCR 10X; 1,6 µL de dNTPs (2,5 mM); 0,6 µL de cada um dos iniciadores (10 pmol); 0,1 µL de DNA polimerase (1 U/mL) e 2 µL de uma solução a concentração de 50 ng/µL do DNA extraído).

A amplificação foi realizada em termociclador Bioer LifePro TC-96/G/H(b)A nas seguintes condições: 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 35 segundos, 55°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto, prosseguidos de 4 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação por PCR foram visualizados através de eletroforese por 1 hora a 5 V/cm, em gel de agarose a 1,4% contendo GelRed.

## 4.5 SELEÇÃO DA REGIÃO GÊNICA DE ANELAMENTO DA SONDA

Para a seleção da região de anelamento da sonda, foram utilizadas 177 sequências da região ITS do DNAr de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*, depositadas no banco de dados *GenBank* (Anexo I).

### 4.5.1 Desenho das sondas cadeado

As sondas de oligonucleotídeos foram desenhadas conforme descrito por Wang e colaboradores (2005) a partir de 177 sequências da região ITS (Anexo I) do genoma de *H. capsulatum* depositadas no banco de dados *GenBank*. A partir da inspeção visual das 177 sequências ITS por meio do programa DNAsp v.5.10.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009), foram identificadas sequências alvo, de aproximadamente 53 nucleotídeos (nt) de comprimento na região ITS1 do DNAr específicas para *H. capsulatum*, contidas nas três variedades do agente (*H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*), com a identificação de posições de polimorfismo único representando potenciais nucleotídeos chave para o fechamento da sonda a ser construída (Figura 5).

Utilizando-se como molde a referida região de diversidade, as sondas cadeado foram compostas por duas sequências de 37 nt complementares à sequência alvo (5'-GGGGGGGTTCCTCCGGTCAGA-3' e 5'-GTGGCCGGGTAGGGGGGT-3'), contendo uma região espaçadora (5'-TGCTTCTTCGGTGCCCATACGAGGTG CGGATAGCTACCGCGCAGACACGATA-3') para fornecer um modelo para o *primer* de ligação da RCA e facilitar a formação da alça, segundo metodologia descrita por Tong e colaboradores (2007) com adaptações.

Para assegurar a eficiência de vinculação das sondas cadeados ao fragmento específico do genoma em questão, as mesmas foram projetadas com o mínimo de estrutura secundária e com uma TM da extremidade 5' de 48°C. Para

aumentar a a especificidade discriminativa da sonda, a extremidade do braço de ligação 3' foi projetada com uma TM de 49°C.

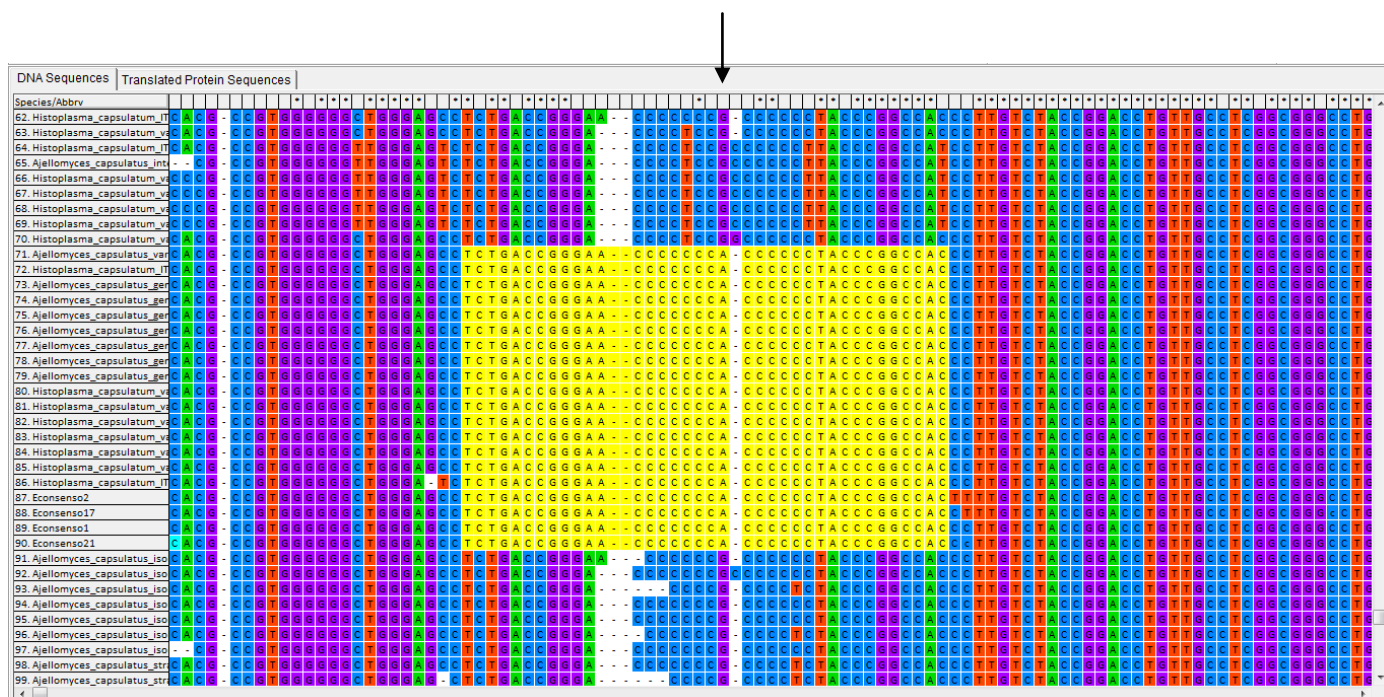


FIGURA 5 – Sequências ITS do DNAr de *Histoplasma capsulatum* utilizadas para o desenho da sonda cadeado. A região indicada em amarelo representa a identificação de diversidade nucleotídica no início da região ITS1 contendo posições de polimorfismo único, sinalizada pela seta, presentes nas três variedades de *H. capsulatum*.

FONTES: O AUTOR, 2014.

#### 4.5.2 Ligação das sondas cadeado

Após a síntese, a reação de ligação das sondas cadeado à sequência alvo amplificada foi realizada utilizando a concentração de 1 pmol do produto de PCR (Item 4.4) do DNA adicionado a 2 U de pfu DNA ligase (Stratagene, Integrated Sciences) e 0.1 µM da sonda cadeado em 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Igepal, 0.01 mM rATP, 1 mM DTT num volume total de reação de 10 µL. A ligação de múltiplo ciclo foi conduzida com um ciclo de 5 minutos a 95°C seguido de 7 ciclos de 95°C durante 30 segundos e 4 minutos de ligação a 63°C (WANG *et al.*, 2005). A verificação da ligação da sonda foi realizada por meio de eletroforese por 1 hora a 5 V/cm, em gel de agarose a 1,4% contendo GelRed.

#### 4.5.3 Reação de Amplificação em Círculo Rolante (RCA)

Dois microlitros do produto de ligação foram usados como molde (*template*) para a reação de RCA. As reações foram realizadas em um volume de 12,5  $\mu$ L, contendo 8 U de Bst DNA polimerase (New England Biolabs), 400  $\mu$ M da mistura de dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados) e 10 pmoL de cada *primer* do RCA em água destilada.

Sinais de circularização da sonda foram amplificados através da incubação a 65°C por 60 minutos, seguidos de 2 minutos a 85°C. A acumulação dos produtos de DNA dupla fita foi visualizada através de eletroforese por 2 horas a 3,5 V/cm, em gel de agarose a 1,7%, verificando-se a especificidade da ligação sonda-molde. Reações positivas foram representadas por um padrão de banda “em escada” semelhante ao do *ladder*, enquanto reações negativas foram reconhecidas pela ausência de bandas.

#### 4.5.4 Aplicação da sonda cadeado: etapas metodológicas

As sondas HcPL1 e HcPL2 após desenhadas e sintetizadas, foram testadas em todas as amostras de DNA total previamente preparadas e seus produtos de ligação foram submetidos à reação de amplificação em círculo rolante (Figura 6).

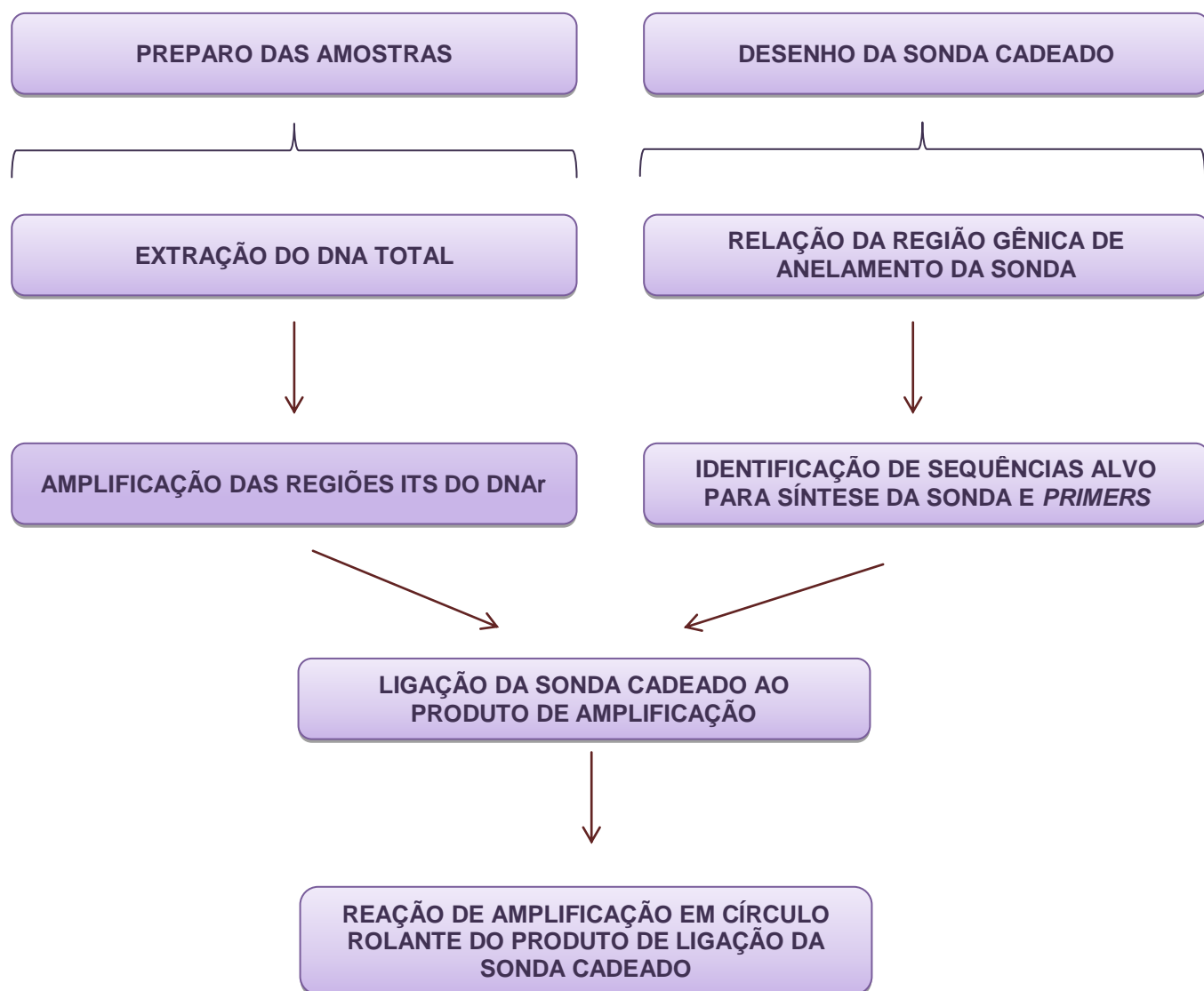


FIGURA 6 – Desenho esquemático das etapas dos procedimentos metodológicos.  
FONTE: O AUTOR, 2014.

## 5 RESULTADOS

Neste estudo foi proposta a comparação de sequências da região ITS do DNAr de *H. capsulatum* para identificação de regiões com alteração nucleotídica compatíveis com o método proposto. Um total de 177 sequências depositadas no banco de dados *Genbank* de linhagens de *H. capsulatum* foi selecionado e alinhado através do programa Mega5.1. A identificação de variações nucleotídicas específicas (Figura 5) na sequência estudada resultou no desenvolvimento de duas sondas cadeado (Quadro 3).

QUADRO 3 - SEQUÊNCIAS DAS SONDAS CADEADO E PRIMERS USADOS NESTE ESTUDO.

Sonda/primers	Sequências (5'-3')
<b>Sonda HcPL1</b>	5'-P- <u>GGGGTCCCGGTCAGAGACT</u> gatca <b>TGCTTCTTCGGTGCCCATTACGAGGTGCGG</b> / AGCTACCGCGCAGACACGATAgtcta <b>CCGGGTAAGGGGGGCGGA</b> -3' 5'-P-
<b>Sonda HcPL2</b>	<u>GGGGGGGTTCCCGGTCAG</u> Agatca <b>TGCTTCTTCGGTGCCCATTACGAGGTGCGG</b> , AGCTACCGCGCAGACACGATAgtcta <b>GTGGCCGGGTAGGGGGGT</b> -3'
<b>Primer-RCA1</b>	5'-ATGGGCACCGAAGAAGCA-3'
<b>Primer-RCA2</b>	5'-CGCGCAGACACGATA-3'

- As sequências sublinhadas são as pontas de ligação da sonda cadeado, as quais são unidas por uma região não específica de ligação.
- *Primer-RCA1* liga-se na sonda cadeado, gerando um ssDNA longo. A sua sequência é a mesma que a do segmento destacado, em sentido reverso.
- *Primer-RCA2* liga-se ao ssDNA nascente, a partir do momento que os seus locais de ligação estiverem disponíveis. Cada *primer* reverso ligado estende e desloca os *primers* a jusante e os seus produtos estendidos. A sua sequência é a mesma que a dos segmentos indicados em itálico.

A região de polimorfismos de nucleotídeo único foi localizada na região ITS1, no sítio 39 (3'-5'), correspondente à uma timina no molde para sonda HcPL1 e no sítio 43 (3'-5'), correspondente à uma adenina no molde para sonda HcPL2, desenhadas no presente estudo (Figura 7).



FIGURA 7 – Sequências nucleotídicas de anelamento das sondas HcPL1 e 2 localizadas no início da região ITS1 contendo o nucleotídeo chave para o fechamento das sondas cadeado durante a reação de ligação à sequência alvo complementar: A - Em destaque a região de anelamento e o nucleotídeo chave T para sonda HcPL1; B - Em destaque a região de anelamento e o nucleotídeo chave A para sonda HcPL2.

FONTE: O AUTOR, 2014.

Um total de 29 amostras de DNA procedentes de isolados clínicos de *H. capsulatum* foi testado para as duas sondas. Após a reação de ligação da sonda cadeado, verificou-se através de eletroforese por uma hora a 104 V/cm, em gel de agarose a 1,4% que apenas a sonda HcPL2 foi específica para *H. capsulatum* var. *capsulatum*, amplificando somente as amostras de DNA de *H. capsulatum* testadas. O resultado das reações de ligação da sonda HcPL2 à sequência alvo nos diferentes DNA testados pode ser observado nas Figuras 8 e 9.

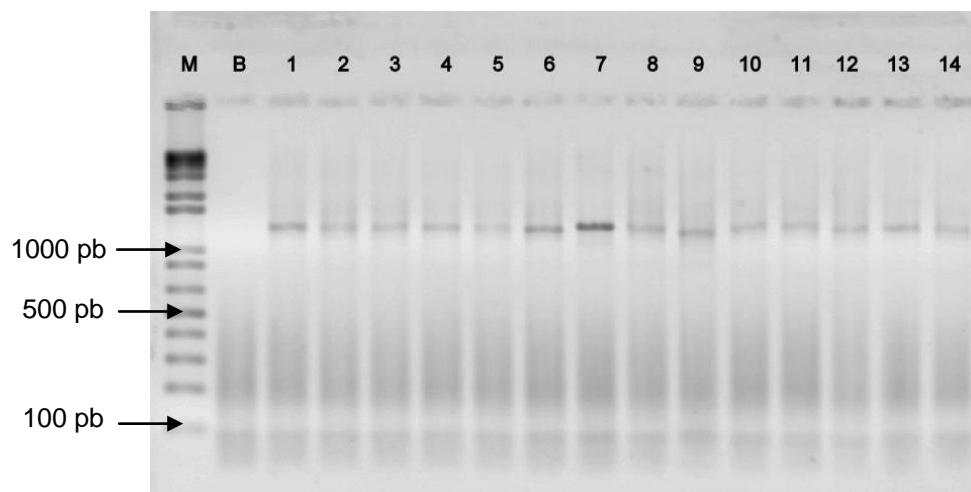


FIGURA 8 - Produtos de ligação da sonda cadeado HcPL2; M - Marcador molecular de 1 Kb; B - Branco; 1 a 14 – Amostras de DNA de *H. capsulatum*, conforme ordem numérica no Quadro 2.

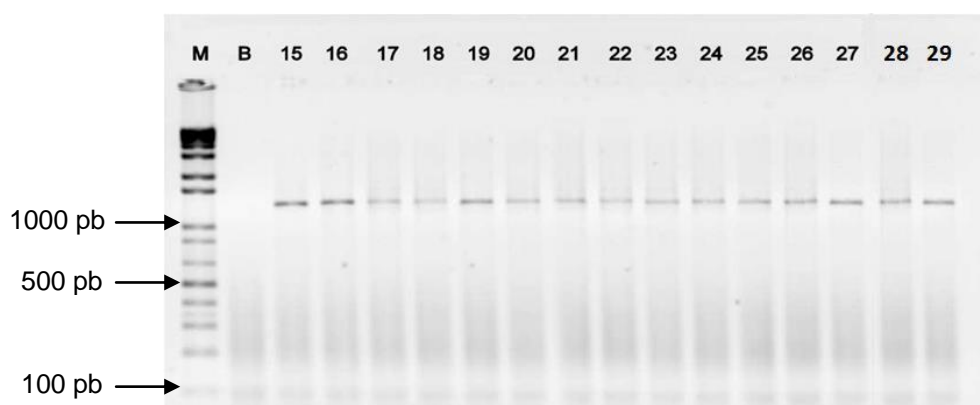


FIGURA 9 - Produtos de ligação da sonda cadeado HcPL2; M - Marcador molecular de 1 Kb; B - Branco; 15 a 29 – Amostras de DNA de *H. capsulatum*, conforme ordem numérica no Quadro 2.

A sonda cadeado denominada HcPL1 foi desprezada por apresentar reações inespecíficas de ligação, ou seja, ligou-se às todas as amostras de *H. capsulatum* testadas, mas ligou-se também quando testada com os controles negativos (Figura 10) e portanto, não foi utilizada nos testes seguintes (reações de exonuclease e de RCA).



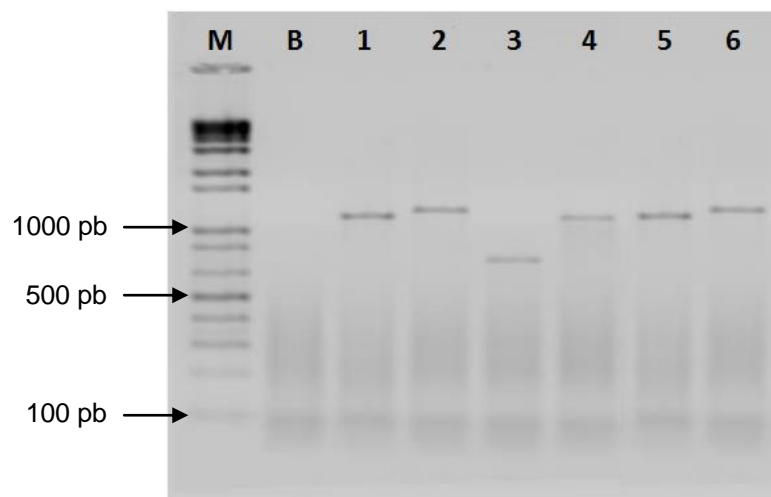


FIGURA 10 - Produtos de ligação cruzada da sonda cadeado HcPL1 com outras espécies de fungos: M - Marcador molecular de 1 Kb; B - Branco; 1 – *Aspergillus* sp.; 2 – *Candida albicans*; 3 – *Scedosporium* sp.; 4 – *Trichophyton* sp.; 5 – *Cryptococcus neoformans*; 6 – *Paracoccidioides brasiliensis*.

Apenas a sonda cadeado denominada HcPL2 foi capaz de ligar-se, com auxílio da enzima Pfu DNA ligase, à região alvo do DNA das 29 amostras de *H. capsulatum* var. *capsulatum* sem ocorrência de ligação cruzada com outras espécies de fungos (*Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Scedosporium* sp. e *Trichophyton* sp.) e de *Leishmania brasiliensis*, utilizados neste estudo como controles negativos. Tais resultados demonstram a especificidade desta sonda (HcPL2) para identificação do agente etiológico em questão. A especificidade da sonda HcPL2 foi testada para *H. capsulatum* var. *capsulatum*, por se tratar da variedade mais comumente encontrada nas regiões onde é endêmica, incluindo o Brasil.

Todos os produtos de ligação específica da sonda HcPL2 receberam tratamento com as enzimas exonuclease I e III. A aplicação de exonuclease I e III nos produtos de ligação da sonda mostrou diferenças significativas na visualização do perfil de amplificação nas reações de RCA, evidenciando os padrões de bandas “em escada” (Figura 11).

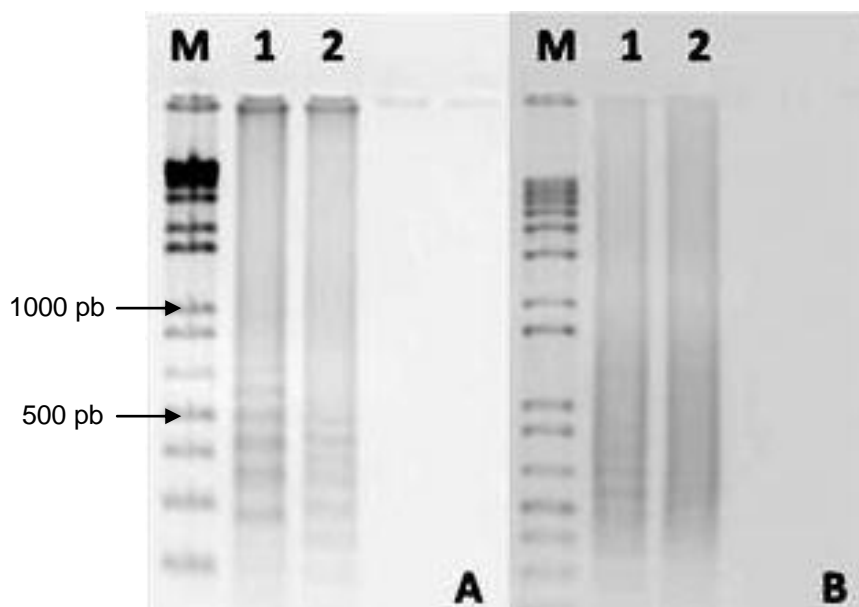


FIGURA 11– Produtos de ligação da sonda cadeado HcPL2 com e sem tratamento. A - Produtos de ligação da sonda HcPL2 tratados com exonuclease I e III. M - Marcador molecular de 1 Kb; 1 e 2 – Amostra 20 de *H. capsulatum*, conforme ordem numérica no Quadro 2; B - Produtos de ligação da sonda HcPL2 sem tratamento com exonuclease I e III. M - Marcador molecular de 1 Kb; 1 e 2 – Amostra 20 de *H. capsulatum*, conforme ordem numérica no Quadro 2.

Após o tratamento com exonucleases I e III, todas as amostras foram preparadas e submetidas à reação de amplificação por RCA e o resultado positivo de cada uma foi verificado através de eletroforese em gel de agarose a 1,7% por 2 horas a 74 V/cm (Figuras 12 e 13).

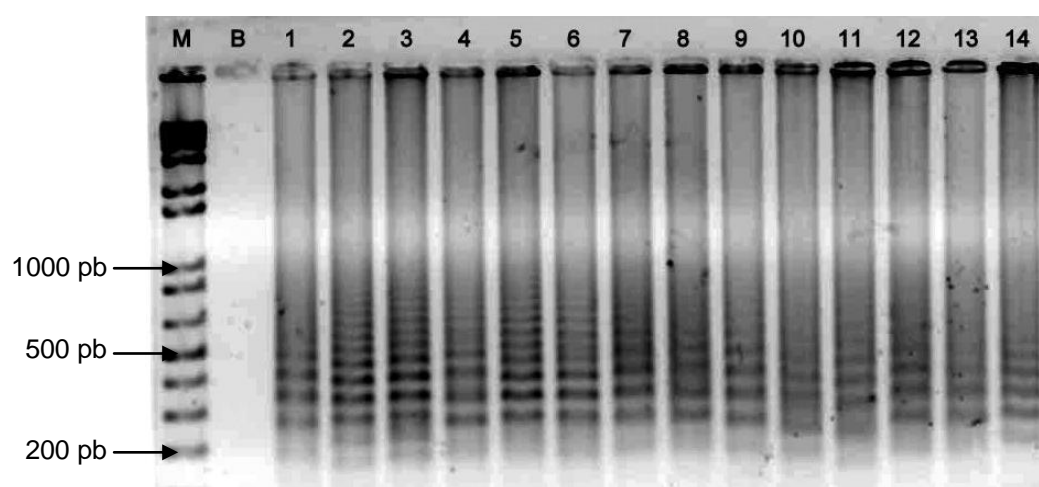


FIGURA 12 - Perfil de amplificação das reações de RCA dos produtos de ligação da sonda HcPL2; M - Marcador molecular de 1 Kb; B - Branco; 1 a 14 - Amostras de DNA de *H. capsulatum*, conforme ordem numérica no Quadro 2.

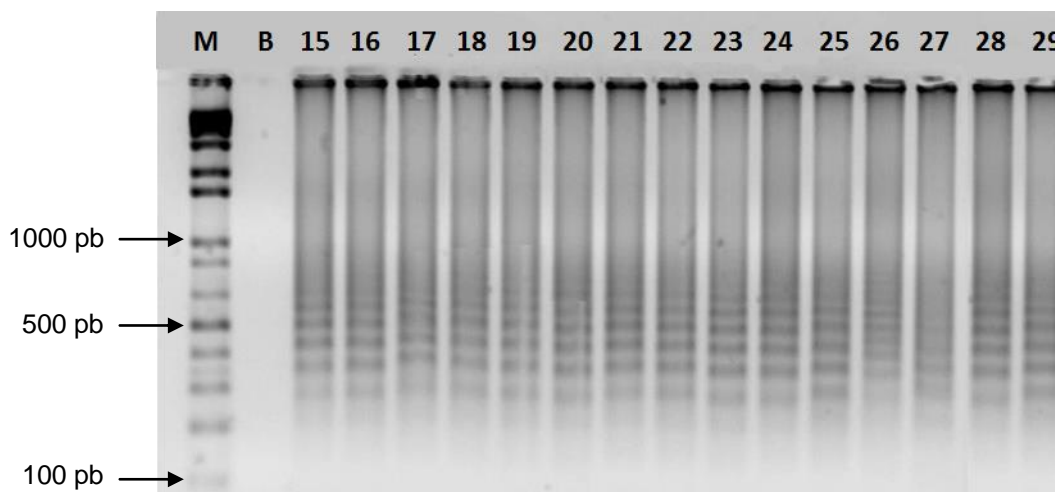


FIGURA 13 - Perfil de amplificação das reações de RCA dos produtos de ligação da sonda HcPL2. M - Marcador molecular de 1 Kb; B - Branco; 15 a 29 - Amostras de DNA de *H. capsulatum*, conforme ordem numérica no Quadro 2.

A especificidade da sonda cadeado HcPL2 foi testada utilizando-se *Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Scedosporium* sp. e *Trichophyton* sp. como controles negativos e confirmada através de eletroforese em gel de agarose a 1,7%, por 2 horas a 74 V/cm, pela ausência da formação do padrão de bandas “em escada” (Figura 14).

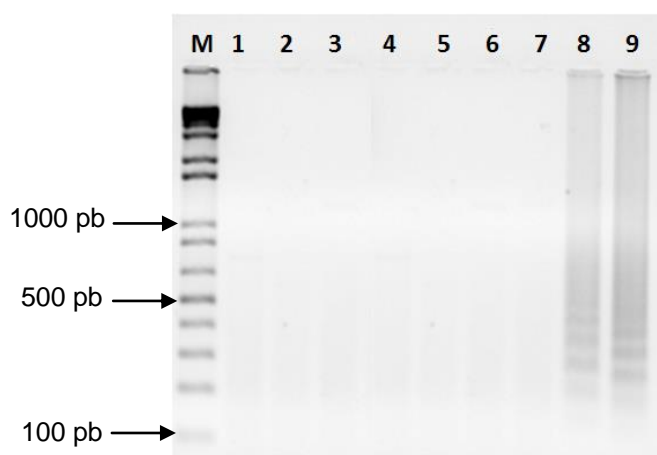


FIGURA 14 – Perfil negativo de amplificação das reações de RCA para controles negativos. M – Marcador molecular de 1 Kb; 1 – *Aspergillus* sp.; 2 – *Candida albicans*; 3 – *Cryptococcus neoformans*; 4 – *Paracoccidioides brasiliensis*; 5 – *Scedosporium* sp.; 6 – *Trichophyton* sp.; 7 – *Leishmania brasiliensis*; 8 e 9 – Amostras 28 e 29 de *H. capsulatum*, respectivamente, conforme ordem numérica no Quadro 2.

## 6 DISCUSSÃO

A histoplasmose é uma doença sistêmica com manifestação clínica no pulmão do hospedeiro, causada pelo fungo *Histoplasma capsulatum* após a inalação de esporos presentes em solos contaminados (AKIN; HERFORD; CICCÌÙ, 2011; ETXEBERRIA-LEKUONA *et al.*, 2013). O diagnóstico precoce da doença é a chave para um tratamento antifúngico correto e bem sucedido (GONZALEZ *et al.*, 2003; WIEDERHOLD; LEWIS, 2009).

Nos últimos anos, a incidência de infecções por fungos oportunistas aumentou consideravelmente em indivíduos imunocomprometidos (ZHOU *et al.*, 2008; NAJAFZADEH *et al.*, 2011; 2013). O avanço no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico confiáveis para detecção rápida e identificação de fungos permanece sendo uma prioridade para a melhoria nos resultados do tratamento de pacientes infectados (NAJAFZADEH *et al.*, 2013).

Neste trabalho foi utilizada a região ITS do DNA ribossomal para estudo no diagnóstico de *H. capsulatum* uma vez que, essa região apresenta características favoráveis como a facilidade de amplificação, devido a utilização de *primers* universais e elevado nível de variação nas sequências, mesmo entre espécies fortemente relacionadas (BUIRAGO *et al.*, 2013). O sequenciamento da região ITS do DNAr de fungos e a viabilização de técnicas que envolvem biologia molecular têm resultado em avanços nas áreas clínica e científica. A identificação precisa de patógenos tem aumentado significativamente o conhecimento da epidemiologia de síndromes clínicas e assim, melhorado o tratamento empírico das mesmas (ZHOU *et al.*, 2008).

A região ITS do DNAr contém sequências espécie-específicas indicadas para a identificação de fungos (CIARDO *et al.*, 2006), possibilitando inclusive a localização de regiões específicas independente das variedades do agente etiológico (SCHOCH *et al.*, 2012). Tais características indicadas pelos autores acima, também foram evidenciadas ao longo do presente estudo, onde num conjunto de 177 sequências da região intergênica do DNAr (ITS1-5,8S-ITS2) de isolados de *H. capsulatum* verificou-se uma região alvo específica localizada no início do ITS1, que possibilitou o desenho das sondas cadeado utilizadas associadamente à

amplificação em círculo rolante. Essa região alvo apresentava variação intraespecífica presente nas três variedades de *H. capsulatum*.

A utilização de sondas cadeado aliadas à técnica de amplificação em círculo rolante (RCA) tem se mostrado uma técnica rápida e precisa, pela alta confiabilidade dos resultados na identificação de fungos de interesse clínico. Tong e colaboradores (2007) relataram que a técnica de amplificação em círculo rolante (RCA) apresenta sensibilidade maior na detecção de mutações de base única que as técnicas convencionais e proporciona assim uma ferramenta adequada à necessidade de exames laboratoriais rápidos e específicos.

No presente estudo, verificou-se que a sonda cadeado HcPL1 apresentou reação cruzada com fungos utilizados como controle negativo. De acordo com os resultados obtidos, a sonda cadeado HcPL1 não se mostrou específica e portanto não poderia ser indicada para detecção de *H. capsulatum*. O procedimento onde diferentes sondas são desenhadas e sintetizadas a partir da região de interesse e descartadas ao apresentarem reação cruzada é comumente reportado (SUN *et al.*, 2011; LACKNER *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2013; HAMZEHEI *et al.*, 2013; NAJAFZADEH *et al.*, 2013).

A sonda cadeado HcPL2 apresentou amplificação específica somente para a região alvo do DNA de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (Figuras 7 e 8), sem ocorrência de reações cruzadas com as linhagens das espécies utilizadas como controle negativo. Tal resultado corrobora o relatado por diversos autores a respeito da efetividade desta técnica para identificação de fungos patogênicos (SUN *et al.*, 2011; NAJAFZADEH *et al.*, 2011; 2013).

Segundo Kong e colaboradores (2008), a reação de ligação da sonda cadeado (antecessora da reação de amplificação por RCA, após tratamento com exonucleases) pode ser realizada apenas com um ciclo de desnaturação inicial, seguido de apenas um ciclo de ligação. Porém o uso de 5 a 7 ciclos, como realizado no presente estudo, é empregado para garantir o rendimento de produtos ao final da reação (NAJAFZADEH *et al.*, 2011; 2013; SUN *et al.*, 2011; HAMZEHEI *et al.*, 2013).

A diferença entre as sondas cadeado resume-se à capacidade de detectar ou não polimorfismos de nucleotídeo único entre as espécies, que é o que faz a sonda ser específica, através do processo de ligação (“fechamento”) da sonda cadeado à

sequência alvo, por meio do único nucleotídeo diferente (DAVARI *et al.*, 2012). No caso das sondas sintetizadas neste estudo, representados pelos nucleotídeos Timina (T), localizado no sítio 39 da região ITS1 (3'-5'), no molde para sonda HcPL1 e Adenina (A), localizado no sítio 43 da região ITS1 (3'-5'), no molde para sonda HcPL2 (Figura 7).

Segundo a literatura, com a exclusão da etapa da reação de exonuclease, tem-se a diminuição do tempo da técnica em cerca de 1 hora (TONG *et al.*, 2007; LACKNER *et al.*, 2012). O tratamento das amostras com as exonucleases I e III tem resultado apenas na melhoria da visualização do padrão de bandas “em escada” após a eletroforese em gel de agarose, não interferindo no resultado final do experimento. Mas, segundo Najafzadeh e colaboradores (2013), com a exclusão desta etapa, em alguns casos, pode-se verificar diferenças no padrão de banda com presença de uma banda única não específica fraca no gel de agarose, que não modifica o resultado negativo para a reação de RCA das amostras em questão. No presente estudo, todos os produtos da sonda HcPL2 foram tratados com as enzimas exonuclease I e III, portanto a formação de banda única fraca no gel de agarose citada por Najafzadeh e colaboradores (2013) não foi observada nas reações com perfil de amplificação negativo, como mencionado acima.

A técnica de RCA caracteriza-se por sua relação custo-benefício, simplicidade, rapidez e especificidade (WANG *et al.*, 2005). Características essas, também verificadas no presente estudo, onde o resultado final do processo era obtido em menos de 12 horas, levando em conta da amplificação da região ITS por PCR até a obtenção do gel de agarose com o perfil de amplificação do DNA nas reações de RCA.

Outra vantagem da técnica é poder ser realizada sob condições isotérmicas com o mínimo de reagentes e equipamentos e não gerar resultados falso-positivos, uma vez que pode ser realizada em condições controladas de temperatura (LACKNER *et al.*, 2012).

Os produtos de amplificação resultantes das reações de RCA neste estudo foram encontrados para todas as amostras de DNA de *H. capsulatum* var. *capsulatum* testadas, após evidênciação da ligação da sonda circularizável ao DNA alvo. Ou seja, houve a ligação da sonda cadeado específica ao DNA alvo de amostras dos diversos isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum*,

confirmando a eficácia da sonda sintetizada no presente estudo, para a identificação do agente etiológico da histoplasmose.

Sendo assim, foi apresentado e testado um método de identificação rápido, simples e específico baseado na técnica de RCA para detecção de *H. capsulatum*. Ou seja, a partir do alinhamento de 177 sequências da região ITS de *H. capsulatum*, foram desenhadas e sintetizadas duas sondas, as quais foram testadas em 29 sequências de DNA e apenas a sonda totalmente específica para *H. capsulatum* var. *capsulatum* foi selecionada.

Além da técnica de RCA ser uma tecnologia inovadora no diagnóstico de doenças, é extremamente simples de ser executada, rápida e não necessita de equipamentos específicos (NILSSON *et al.*, 2006), seu produto de amplificação pode ser visualizado através de eletroforese em gel de agarose (DAVARI *et al.*, 2012; NAJAFZADEH *et al.*, 2013).

Levando-se em conta resultados positivos obtidos e a simplicidade do método, pode-se cogitar a utilização da técnica de RCA para diagnóstico de fungos em laboratórios com grande número de amostras a serem testadas. Entretanto, como o RCA é um método baseado em PCR, algumas limitações e problemas similares podem ser esperados (NAJAFZADEH *et al.*, 2013). A técnica de RCA mostrou ser uma ferramenta de amplificação de DNA altamente versátil, surgindo como alternativa no diagnóstico rápido e preciso de *H. capsulatum* até mesmo em amostras com baixa concentração de DNA (ZHAO *et al.*, 2008).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o uso de sondas cadeado associado à técnica de RCA é útil para a detecção de *H. capsulatum* em isolados com procedência clínica, recuperados em ágar. Para testes diretamente em amostras clínicas, é possível fazer a amplificação do material a partir da extração do DNA total das amostras.

O desenvolvimento da sonda cadeado específica para *H. capsulatum* surge como uma importante ferramenta para a identificação do patógeno, uma vez que trata-se de um método de diagnóstico rápido, sensível e reprodutível, o que diminui a chance de falsos negativos. A interpretação dos resultados é simples e baseia-se em resultados positivo ou negativo, eliminando assim critérios subjetivos em amostras que apresentam resultados negativos, podendo ser utilizadas aliadas à técnicas convencionais atuais.

Esta é a primeira proposta de uso de sonda cadeado para *H. capsulatum*, a qual demonstrou alta especificidade quando aplicada em amostras de DNA isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, o que faz da sonda desenhada, HcPL2, associada à técnica de RCA, uma promissora e eficaz ferramenta para a identificação deste agente, podendo ser inserida na rotina laboratorial e assim, permitir que pacientes sejam brevemente diagnosticados e corretamente tratados.



## 7 CONCLUSÃO

As sequências ITS do gene DNAr foram adequadas para o desenvolvimento de uma sonda RCA cadeado para identificação de *H. capsulatum*.

A sonda HcPL2 mostrou-se uma ferramenta efetiva na detecção de produtos de amplificação do DNA genômico de *H. capsulatum*.

A sonda cadeado espécie-específica desenvolvida e testada neste estudo visando o diagnóstico de *H. capsulatum* foi específica, de aplicação rápida e fácil reprodutibilidade, fazendo desta sonda, em associação com a técnica RCA, uma promissora ferramenta para o diagnóstico rápido de histoplasmose.

## 8 REFERÊNCIAS

- AJELLO, L. Geographic distribution of *Histoplasma capsulatum*, In M.C. Sweany (eds.), *Histoplasmosis*. Charles C. Thomas, Springfield, p. 88-98, 1960.
- AKIN, L.; HERFORD, A. S.; CICCÌÙ, M. Oral presentation of disseminated histoplasmosis: A case report and literature review. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v.69, p. 535-541, 2011.
- ALLTON, D. R.; RIVARD, R. G.; CONNOLLY, P. A. *et al.* Detection of latin american strains of *Histoplasma* in a murine model by use of a commercially available antigen test. **Clinical and vaccine immunology**. p. 802-806, 2010.
- AMENI, G. Epidemiology of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis) in carthorses in Ethiopia. **Vet. J.** v.172, n.1, p. 160-165, 2006.
- ANJOS, D. T.; NUNES, É.; SOUZA, R.; MOREIRA, A. V.; SOUZA, M. C. Incidência de histoplasmose em espeleólogos e monitores ambientais do parque estadual turístico do Alto Ribeira (PETAR). **Sociedade Brasileira de Espeleologia**, 2007.
- ANTONELLO, V. S.; ZALTRON, V. F.; VIAL, M.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Oropharyngeal histoplasmosis: Report of eleven cases and review of the literature. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.44, p. 26-29, 2011.
- ARANGO-BUSTAMANTE, K.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. *et al.* Diagnostic value of culture and serological tests in the diagnosis of histoplasmosis in HIV and non-HIV colombian patients. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2013. doi: 10.4269/ajtmh.13-0117.
- ASSI, M.; MARTIN, S.; WHEAT, L. J. *et al.* Histoplasmosis after solid organ transplantation. **Infectious Diseases Society of America**. p. 1–26, 2013.
- BABADY, N. E.; BUCKWALTER, S. P.; HALL, L.; LE FEBRE, K. M.; BINNICKER, M. J.; WENGENACK, N. L. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* from culture isolates and clinical specimens by use of real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 3204-3208, 2011.
- BENEVIDES, C. F. L.; DURÃES, R. O.; AQUINO, L. *et al.*, Histoplasmose adrenal bilateral em um homem imunocompetente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, p. 230-233, 2007.
- BIALEK, R.; FEUCHT, A.; AEPINUS, C.; JUST-NÜBLING, G.; ROBERTSON, V. J.; KNOBLOCH, J.; HOHLE, R. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. **J. Clin. Microbiol.** v.40, n.5, p. 1644-1647, 2002.

- BRACCA, A.; TOSELLO, M. E.; GIRARDINI, J. E.; AMIGOT, S. L.; GOMEZ, C.; SERRA, E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.4., p. 1753-1755, 2003.
- BRANDÃO, J.; WOODS, S.; FOWLKES N.; LEISSINGER, M.; BLAIR, R.; PUCHEU-HASTON, C.; JOHNSON, J.; PHILLIPS, C. E.; TULLY, T. Disseminated histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum*) in a pet rabbit: case report and review of the literature. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 2014. doi: 10.1177/1040638713516623.
- BRAZÃO-SILVA, M. T.; ANDRADE, M. F.; FRANCO, T.; RIBEIRO, R. I.; SILVA, W. DOS S.; FARIA, G. *et al.* Paracoccidioidomycosis: A series of 66 patients with oral lesions from an endemic area. **Mycoses**. v.54, p. 189-195, 2011.
- BRAZÃO-SILVA, M. T.; AGUILAR, L. T, SIQUEIRA, C. S.; DE SOUSA, S. C.; PINTO-JUNIOR, D. DOS S. Tongue syphilitic lesion and the usefulness of immunohistochemistry. **Infection**. v. 40, p. 231-232, 2012.
- BRAZÃO-SILVA, M.T.; MANCUSI, G. W.; BAZZOUN, F. V.; ISHISAAKI, G.Y.; MARCUCCI, M.A gingival manifestation of histoplasmosis leading diagnosis. **Contemp. Clin. Dent**. v.4, n.1, 2013.
- BUENO-FISCHER, G.; MOCELINF, H.; SEVERO, C. B.; OLIVEIRA, F. M.; XAVIER, M. O.; SEVERO, L. C. Histoplasmosis in children. **Pediatric Respiratory Reviews**. v. 10, p. 172–177, 2009.
- BITRAGO, M. J.; BERENGUER, J.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease**. v. 25, n. 5, p. 665–668, 2006.
- BITRAGO, M. J.; CANTEROS, C. E.; LEÓN, G. F.; GONZÁLEZ, Á.; OLIVEIRA, M. M.; MUÑOZ, C. O.; RAMIREZ, J. A.; TORANZO, A. I.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; CUENCA-ESTRELLA, M. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. **Rev. Iberoam Micol**. v.30, n.4, p.256-260, 2013.
- CALZA, L.; MANFREDI, R.; DONZELLI, C.; MARINACCI, G.; COLANGELLI, V.; CHIODO, F. Disseminated histoplasmosis with atypical cutaneous lesions in an Italian HIV-infected patient: another autochthonous case. **HIV Medicine**. v.4, p.145-148, 2003.
- CANTEROS, C. E.; IACHINI, R. H.; RIVAS, M. C.; VACCARO, O.; MADARIAGA, J.; GALARZA, R. *et al.* Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*. **Rev. Arg. de Microbiología**. v.37, p.46-56, 2005.

- CASOTTI, J. A. S.; MOTTA, T. Q. R.; FERREIRA JUNIOR, C. U. G.; CERUTTI JUNIOR, C. Disseminated histoplasmosis in HIV positive patients in Espírito Santo state , Brazil: a clinical-laboratory study of 12 cases (1999-2001). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**.v.10, n.5, p. 327-330, 2006.
- CATANIA, J.; MARTIN, S. S. G.; COREY, R.; SEXTON, D. S. Diagnostic dilemma in a returning traveler with fever.**Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 77, p. 85–86, 2013
- CHAKRABARTI, A.; SLAVIN, M. A. Endemic fungal infections in the Asia-Pacific region.**Med. Mycol.** v.13, n.4, p. 337-344, 2011.
- CHONG, S.; LEE, K. S.; YI, C. A.; CHUNG, M. J.; KIM, T. S.; HAN, J. Pulmonary fungal infection: imaging findings in immunocompetent and immunocompromised patients. **Eur. J. Radiol.** v.59, n.3, p. 371-383, 2006.
- CIARDO, D.E.; SCHAR, G.; BOTTGER, E. C.; ALTWEGG, M.; BOSSHARD, P. P. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. **J. Clin. Microbiol.** v.44, p. 77-84, 2006.
- COLOMBO, A. L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A.; QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America.**Med. Mycol.**v.49, p. 785-795, 2011.
- CRUZ, R. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* Darling. **Rev. Chilena Infectol.** v.30, n.3, p. 311-312, 2013.
- CUELLAR-RODRIGUEZ, J.; AVERY, R. K.; LARD, M.; BUDEV, M.; GORDON, S. M. *et al.* Histoplasmosis ins solid organ transplant recipients: 10 years of experience at a large transplant center in an endemic area. **Clin. Infect. Dis.** v.49, n.5, p. 710-716, 2009.
- CUENCA-ESTRELLA, M. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. **Revista Iberoamericana de Micología**. 2013. doi: 10.1016/j.riam.2013.03.004.
- DAL BELLO, A. G.; SEVERO, C. B.; OLIVEIRA, F. M.; HALLAL JUNIOR, R. J.; HOCHHERGGER, B.; SEVERO, L. C. Histoplasmosis presenting with multiple pulmonary nodules. A case mimicking radiological features of pulmonary metastasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v.55, n.3, p. 209-211. 2013.
- DANTAS, K. C.; FREITAS, R. S.; MOREIRA, A. P. V.; SILVA, M. V.; BENARD, G.; VASCONCELLOS, C.; CRIADO, P. R. The use of nested polimerase chain reaction (nested PCR) for the early diagnosis of *Histoplasmosis capsulatum* infection in serum and whole blood of HIV-positive patients. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.88, n.1, p. 141-143, 2013.

DAVARI, M.; VAN DIEPENINGEN, A. N.; BABAI-AHARI, A.; ARZANLOU, M.; NAJAFZADEH, M. J.; VAN DER LEE, T. A. J.; DE HOOG, G. S. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). **Journal of Microbiological Methods**.v.89, p. 63-70, 2012.

DEAN, F. B.; NELSON, J. R.; GIESLER, T. L. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. **Gen Research**. v.11, p. 1095-1099, 2001.

DE HOOG, G. S.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. **Mycoses**. v. 41, p.183–189, 1998.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht, 2000.

DEMIDOV, V. V. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, n.2, p. 542–548, 2002.

DIAS, M. A. G., Aspectos epidemiológicos de *Histoplasma capsulatum* em morcegos em áreas urbanas do estado de São Paulo. PPGIB/USP (Dissertação Mestrado), São Paulo, 89p, 2009.

DUBOIS, A.; JANSSENS, P. G.; BRUTSAERT, P.; VANBREUSEGHEM, R. Un cas d'histoplasmose africaine; avec une note mycologique sur *Histoplasma duboisii* n.sp. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.** v.32, n.6, p. 569–584, 1952.

EBENYE, C. M. A case of disseminated histoplasmosis detected in peripheral blood smear staining revealing AIDS at terminal phase in a female patient from Cameroon. **Case Reports in Medicine**. 2012. doi: 10.1155/2012/215207.

EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**.v.4, n.4, p. 411, 1991.

ELÍAS, N. A.; CUESTAS, M. L.; SANDOVAL, M. *et al.* Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* directly from cultures by multiplex PCR. **Mycopathologia**. v.174, p. 451-456, 2012.

ESCOBAR, B.; MALDONADO, V. N.; ANSARI, S.; SARRIA, J. C. Antigen negative gastrointestinal histoplasmosis in an AIDS patient. **American Journal of Cases Report**. v. 15, p. 90-93, 2014.

ETXEBERRIA-LEKUONA, D.; ILZARBE, G. H.; MÉNDEZ-LOPEZ, I.; RICARTE, S. P.; ARRIETA, V. A. Histoplasmosis progresiva aguda diseminada em uma paciente joven inmunocompetente. **Revista Clínica Española**. 2013. doi: 10.1016/j.rce.2013.07.014.

- FAIOLLA, R. C. L.; COELHO, M. C.; SANTANA, R. C.; MARTINEZ, R. Histoplasmosis in immunocompetent individuals living in an endemic area in the Brazilian Southeast. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.4, n.4, p. 461-465, 2013.
- FENG, P.; KLAASSEN, C. H. W.; MELS, J. F.; NAJAFZADEH, M. J.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; XI, L.; DE HOOG, G. S. Identification and typing of isolates of *Cyphellophora* and relatives by use of amplified fragment length polymorphism and rolling circle amplification. v.51, n.3, p. 931-937, 2013.
- FERREIRA, O. G.; CARDOSO, S. V.; BORGES, A. S.; FERREIRA, M. S.; LOYOLA, A. M. Oral histoplasmosis in Brazil. **Oral. Surg. Oral. Med.** v. 93 p. 654-659, 2002.
- FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Histoplasmosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.42, p. 192-198, 2009.
- FIRE, A.; XU, S. Rolling replication of short DNA circles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.92, p. 4641-4645, 1995.
- FRÍAS, L.; ARENA, L.; TAYLOR, M.; ACOSTA, A.; REYES-MONTES, J. Development of specific sequence-characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. **J Clin Microbiol**. v.50, n.3, p. 673-679, 2012.
- GAGO, S.; ESTEBAN, C.; VALERO, C.; ZARAGOZA, O.; PUIG DE LA BELLACASA, J.; BUITRAGO, M. J. A Multiplex real-time PCR assay for identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* in samples from AIDS patients with opportunistic pneumonia. **J. Clin. Microbiol**. v.52, n.4, p. 1168-1176, 2014.
- GANGAT, N.; LIN, Y.; ELKIN, P. L. 68-year-old man with fatigue, fever and weight loss. **Mayo Clin. Proc.** v.80, n. 7, p. 939-942, 2005.
- GAUR, P. K.; LICHTWARDT, R. W.; HAMRICK, J. L. Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. **Exp. Mycol.** v.5, p. 69-77, 1981.
- GAVO, P. B. Fungos do trato respiratório de equinos: Destaque para o isolamento de espécie de *Candida não-albicans*. PPGCV/UECE (Dissertação de Mestrado). Fortaleza, 86p., 2012.
- GE, L.; ZHOU, C.; SONG, Z.; ZHANG, Y.; WANG, L. *et al.* Primary localized histoplasmosis with lesions restricted to the mouth in a Chinese HIV-negative patient. **Int. J. Infect. Dis.** v.14, p. 325-328, 2010.
- GONZÁLEZ, G. M.; TIJERINA, R.; GRAYBILL, J. R. *et al.* Activity of posaconazole against *Pseudallescheria boydii*: In vitro and In vivo assays. **Antimicrob Agents Chemother**. v.47, p. 1436-1438, 2003.

GOPALAKRISHNAN, R.; NAMBI, P.; RAMASUBRAMANIAN, V.; GHAFUR, K. A.; PARAMESWARAN, A. Histoplasmosis in India: Truly Uncommon or Uncommonly Recognised? **JAPI**. v. 60, p. 25-28, 2012.

GRIM, S. A.; PROIA, L.; MILLER, R.; ALHYRABA, M. COSTAS-CHAVARRI, A. *et al.* A multicenter study of histoplasmosis and blastomycosis after solid organ transplantation. **Transplant Infectious Disease**. v.14, n.1, p. 17-23, 2012.

GUARNER, J.; BRANDT, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21<sup>st</sup> century. **Clinical Microbiology Reviews**. v.24, n.2, p. 247-280, 2011.

GUIMARÃES, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Diagnosis of histoplasmosis. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, n.1, p. 1–13, 2006.  
GUIOT, H. M.; BERTRAN-PASARELL, J.; TORMOS, L. M.; GONZALEZ-KEELAN, C.; PROCOP, G. W.; FRADERA, J. *et al.* Ileal perforation and reactive hemophagocytic syndrome in a patient with disseminated histoplasmosis: the role of the real-time polymerase chain reaction in the diagnosis and successful treatment with amphotericin Blipid complex. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 57, n. 12, p.429–433, 2007.

HAGE, C. A.; WHEAT, L. J.; LOYD, J.; ALLEN, S. D.; BLUE, D.; KNOX, K. S. Pulmonary histoplasmosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. v.29, p. 151-165, 2008.

HAGE, C. A.; BOWYER, S.; TARVIN, S. E.; HELPER, D.; KLEIMAN, M. B.; WHEAT, L. J. Recognition, diagnosis and treatment of histoplasmosis complicating tumor necrosis factor blocker therapy. **Clinical Infectious Diseases**. v.50, n.1, p. 85-92, 2010.

HAMZEHEI, H.; YAZDANPARAST, S. A.; DAVOUDI, M. M.; KHODAVAISY, S.; GOLEHKHEYLI, M.; ANSARI, S.; DE HOOG, G. S.; BADALI, H. Use of rolling circle amplification to rapidly identify species of *Caldophialophora* potentially causing human infection. **Mycopathologia**. v.175, p. 431-438, 2013.

HAWKSWORTH, D. L.; CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A.; REYNOLDS, D. R.; SAMSON, R. A. *et al.* The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. **IMA Fungus**. v.2, n.1, p. 105-112.

HIGHLAND, M. A.; CHATURVEDI, S.; PEREZ, M.; STEINBERG, H.; WALLACE, R. Histologic and molecular identification of disseminated *Histoplasma capsulatum* in a captive brown bear (*Ursus arctos*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.23, n.4, p. 764-769, 2011.

HOLBROOK, E. D.; SMOLNYCKI, K. A.; YOUSEFF, B. H.; RAPPLEYE, C. A. Redundant catalases detoxify phagocyte reactive oxygen and facilitate *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. **Infection and Immunity**. v.81, n.7, p. 2334-2346, 2013.

IMANO, E. C. Variabilidade em *Histoplasma capsulatum*. PPGMPP/UFPR (Dissertação de Mestrado), Curitiba, 139p., 2005.

- ISON, M. G.; LLATA, E.; CONOVER, C. S. *et al.* Transmission of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus from an organ donor to four transplant recipients. **Am. J. Transplant.**v.11, n.6, p. 1218–1225, 2011.
- JULG, B.; ELIAS, J.; ZAHN, A.; KOPPEN, S.; BECKER-GAAB, C.; BOGNER, J. R. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. **J Travel. Med.**, v. 15, p. 133-136, 2008.
- KAOCHEROEN, S.; WANG, B.; TSUI, K, M.; TRILLES, L.; KONG, F.; MEYER, W. Hyperbranched rolling circle amplification as a rapid and sensitive method for species identification within the *Cryptococcus* species complex. **J. Eletrop** v.29, p. 3183-3191, 2008.
- KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clinical Microbiology Rev.** v. 20, p.115–132, 2007.
- KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Clin.Chest.Med.** v.30, p. 217-225, 2009.
- KEATH, E. J.; SPITZER, E. D.; PAINTER, A. A.; TRAVIS, S. J. *et al.* DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*. **J. Clin. Microbiol.**v.27, n.10, p. 2369-2372, 1989.
- KERSULYTE, D.; WOODS, J. P.; KEATH, E. J.; GOLDMAN, W. E.; BERG, D. E. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. **Journal of Bacteriology.**v.174, n.22, p. 7075-7079, 1992.
- KONG, F.; TONG, Z.; CHEN, X.; SORRELL, T. *et al.* Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling circle amplification. **Journal of Clinical Microbiology.**v.46, n.4, p. 1192-1199, 2008.
- KROETZ, D. N.; DEEPE, G. S. The role of cytokines and chemokines in *Histoplasma capsulatum* infection. **Cytokine.**v.58, n.1, p. 112-117, 2012.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology.**1ª ed. Lea e Febiger, Philadelphia, 1992.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Identificação dos fungos. In: **Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** 1º ed. São Paulo: Sarvier/Fapesp, v.1, cap.2, p.326-330, 1998.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. (eds). Tratado de Micologia Médica. Editora de livros Médicos LTDA., São Paulo, p. 639-729, 2002.
- LACKNER, M.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; LU, Q.; DE HOOG, G. S. Rapid identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* Strains by Using Rolling Circle Amplification. **Applied and Environmental Microbiology.**v.78, n.1, p. 126-133, 2012.



LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**.v.25, p. 1451–1452, 2009.

LIMA, R. F.; BORBA, C. de M.; de LIMA, R. F. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserve by different methods. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18, n.4, p. 191-196, 2001.

LIZARDI, P. M.; HUANG, X.; ZHU, Z.; BRAY-WARD, P.; THOMAS, D. C.; WARD, D. C. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. **Nature genetics**.v.19, p. 225-232, 1998.

MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, E. *et al.* R. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, p. 3305-3318, 2010.

MAGRINI, V.; GOLDMAN, W. E. Molecular mycology: a genetic toolbox for *Histoplasma capsulatum*. **Trends Microbiol.** v.9, p. 541-546, 2001.

MARTINS, R. DE C.; NIGRI, D. H.; MONTEIRO, A. S.; ADDOR, G.; FRANCO, C. A. DE B. Histoplasmoses pulmonar em clínica privada no Rio de Janeiro. **Revista Pulmão**.v.14, n.3, p. 197-201, 2005.

MATA-ESSAYAG, S.; COLELLA, M. T.; ROSELLÓ, A. DE CAPRILES, C. H.; LANDAETA, M. E. *et al.* Histoplasmosis: a study of 158 cases in Venezuela, 2000-2205. **Medicine (Baltimore)**.v.87, p. 193-202, 2008.

MATULIONYTE, R.; GARBINO.; UCKAY, I.; LAMBERT, J. F.; HIRSCHL, B. Disseminated histoplasmosis in an HIV-infected patient discovered by routine blood smear staining. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.24, p. 361-361, 2005.

MAUBON, D.; SIMON, S.; AZNAR, C. Histoplasmosis diagnosis using a polimerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. **Diagnostic Microbiologic and Infectious Disease**.V.58, n. 4, p. 441-444, 2007.

MCKINSEY, D. S.; MCKINSEY, J. P. Pulmonary histoplasmosis. **Semin. Respir. Crit. Care. Med.** v.32, p. 735-744, 2011.

MOEN, M. D.; LYSENG-WILLIAMSON, K.A.; SCOTT, L. J. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. **Drugs**.v.69, n.3, p. 361-392, 2009.

MUKHOPADHYAY, M. D.; SANJAY, M. D.; KATZENSTEIN, A. A. Biopsy findings in acute pulmonary histoplasmosis: unusual histologic features in 4 cases mimicking lymphomatoid granulomatosis. **American Journal of Surgical Pathology**. v.34, n.4, p. 541-546, 2010.

MUKHOPADHYAY, M. D.; DOXTADER, E. E. Visibility of *Histoplasma capsulatum* within histiocytes on hematoxylin and eosin distinguishes disseminated histoplasmosis from other forms of pulmonary histoplasmosis. **Human Pathology**. v.44, p. 2346-2352, 2013.

MUÑOZ, B.; MARTÍNEZ, M. Á.; PALMA, G. *et al.* Molecular characterization of *Histoplasma capsulatum* isolated from a outbreak in treasure hunters *Histoplasma capsulatum* in treasure hunters. **BMC Infectious Diseases**. v.10, p. 264-270, 2010.

MUZYKA, B. C.; EPIFANIO, R. N. Update on oral fungal infections. **Dental Clinicals of NA**. v.57, n.4, p. 561-581, 2013.

NACHER, M.; ADENIS, A.; ADRIOUCH, L.; DUFOUR, J. *et al.* Short report: What is AIDS in the Amazon and the Guianas? Establishing the burden of disseminated histoplasmosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.84, n.2, p. 239-240, 2011.

NACHER, M.; ADENIS, A. BLANCHET, D.; VANTILCKE, V.; DEMAR, M.; BASURKO, C.; GAUBERT-MARÉCHAL, E.; DUFOUR, J.; AZNAR, C. CARME, B.; COUPPIÉ, P. Risk Factors for Disseminated Histoplasmosis in a Cohort of HIV-Infected Patients in French Guiana. **PLoS.Negl.Trop. Dis**.v. 8, n. 1, p. 1-7, 2014.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J. VICENTE, V. A.; DE HOOG, G. S. Rapid detection and identification of fungal pathogens by rolling circle amplification (RCA) using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**. v.54, p. 577-582, 2011.

NAJAFZADEH, M. J.; DOLATABADI, S.; SARADEGHI KEISARI, M.; NASERI, A.; FENG, P.; DE HOOG, G. S. Detection and identification of opportunistic *Exophiala* species using the rolling circle amplification of ribosomal internal transcribed spacers. **Journal of Microbiological Methods**.v.94, p. 338–342, 2013.

NEGRONI, R. Histoplasmosis en América Latina. **Biomédica Inst. Nac.de Salud**. v.31, n.3, p. 301-304, 2011.

NILSSON, M.; MALMGREN, H.; SAMIOTAKI, M.; KWIATKOWSKI, M.; CHOWDHARY, B. P.; LANDEGREN, U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. **Science**, n. 265, p. 2085–2088, 1994.

NILSSON, M.; DAHL, F.; LARSSON, C.; GULBERG, M.; STENBERG, J. Analyzing genes using closing and replicating circles. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 83-88, 2006.

NORKAEW, T.; OHNO, H.; SRIBUREE, P. *et al.* Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by nested PCR. **Mycopathologia**. 2013. doi: 10.1007/s11046-013-9701-9.

NOSANCHUK, J. D.; GACSER, A. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. **Microbes Infect**. v.10, p. 973–977, 2008.

OLIVEIRA, R. M. Z.; GUIMARÃES, A. F.; NOSANCHUK, J. D.; MUNIZ, M. M.; ALBUQUERQUE, P. C.; PAES, R. A. Histoplasma. In: LIU, D. Molecular Detection of Human Fungal Pathogens. Austrália: **CRC Press**, p.263-273, 2011.

O'SULLIVAN, M. V.; WHITBY, M.; CHAHOUD, C.; MILLER, S.M. Histoplasmosis in Australia: A report of a case with a review of the literature. **Aust. Dent. J.** v. 49, p. 94-97, 2004.

PATEL, J. B.; BATANGHARI, J. W.; GOLDMAN, W. E. Probing the yeast phase-specific expression of the CPB1 gene in *Histoplasma capsulatum*. v.180, n.7, p. 1786-1792, 1998.

PASSONI, L. F. C.; RIBEIRO, S. R.; SIDI, L. C.; GIORDANI, M. L. L.; FERRAZ, G. G. S.; MENEZES, J. A. Histoplasmosse disseminada como primeira manifestação de AIDS: Um diagnóstico tardio demais. **Revista Médica**. v.37, n.1, 2003.

PEREIRA, G. H.; ALMEIDA, L. Y.; OKUBO, R. S.; MARCHIORI, E. Histoplasmosse pulmonar presente com sinal do halo em TC em um paciente imunocompetente. **J. Bras. Pneumol.** v.39, n.4, p. 523-524, 2013.

PERROTTA, D.; ABRANTES, R.; CANTEROS, C.; RODERO, L.; DAVEL G. Molecular characterization of isolates of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* by RAPD-PCR in Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.33, n.3, p. 160-166, 2001.

QUIST, E. M.; BELCHER, C.; LEVINE, G.; JOHNSON, M.; HEATLEY, J. J.; KIUPEL, M.; GIRI, D. Disseminated histoplasmosis with concurrent oral candidiasis in an Eclectus parrot (*Eclectus roratus*). **Avian Pathology**. v.40, n.2, p. 207-211, 2011.

RAPPO, U.; BEITLER, J. R.; FAULHABER, J. R.; FIROZ, B.; HENNING, J.S.; THOMAS, K. M. *et al.* Expanding the horizons of histoplasmosis: Disseminated histoplasmosis in a renal transplant patient after a trip to Bangladesh. **Transpl. Infect. Dis.** v.12, p. 155-160, 2010.

RICKERTS, V.; BIALEK, R.; TINTELNOT, K.; JACOBI, V.; JUST-NÜBLING, G. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. **Eur. J. Clin. Infect. Dis.**, v.21, p.821–823, 2002.

RIPPON, J. W. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. **Medical Microbiology**. W. B. Saunders Company, 3ª ed, p. 381-432, Philadelphia, 1988.  
RIPPON, J. W. Tratado de Micologia Médica, Hongos y Actinomicetos Patógenos. 3ª ed Interamericana MacGraw Hill. Buenos Aires, 1990.

ROSSINI, T. F.; GOULART, L. S. Classic histoplasmosis: review. **RBAC**. v. 38, n. 4, p. 275-279, 2006.

SEVERO, L. C.; LEMOS, A. C. M.; LACERDA, H. R. Mediastinal histoplasmosis: report of the first two Brazilian cases of mediastinal granuloma. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.47, p. 103-105, 2005.

SCHEEL, C. M.; ZHOU, Y.; THEODORO, R. C.; ABRAMS, B. *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method to detect *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v.52, n. 2, p. 483-488, 2014.

SCHNUR, R. A.; NEWMAN, S. L. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of super-oxide anion. **J. Immunol.** v.144, p. 4765-4772, 1990.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.109, p. 6241-6246, 2012.

SEVERO, L. C.; OLIVEIRA, F. M.; IRION, K.; PORTO, N. S.; LONDERO, A. T. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v.43, n.4, p. 183-187, 2001.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Capítulo 3 – Criptococose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.35, n.11, p. 1136-1144, 2009.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; MALTA, M. H. B.; MAFFEI, C. M. L.; RAMIREZ, L. E. *Histoplasma capsulatum* isolated from *Didelphis albiventris* (marsupialia: Didelphidae) in the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**., v.18, n.4, p. 180-182, 2001.

SIMON, S.; VERON, V.; BOUKHARI, R.; BLANCHET, D.; AZNAR, C. Detection of *histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polimerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**.v.66, p. 268-273, 2010.

SRINIVASAN, A.; KLEIMAN, M. B.; DEBELENKO, L.; STOKES, D. C.; DE VINCENZO, J.; WHEAT, J. L. False-negative Histoplasma antigen in acute pulmonary histoplasmosis: the value of urinary concentration by ultrafiltration and heat denaturation of serum proteins in de-tection of Histoplasma antigen. **Pediat. Infect. Dis.** v. 28, p. 447–449, 2009.

SUN, J.; LI, X.; ZENG, H.; XIE, Z.; LU, C.; XI, L.; DE HOOG, G. S. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid diagnosis of *Penicillium marneffe* in archived tissue samples. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.58, p. 381-388, 2010.

SUN, J. NAJAFZADEH, M. J.; ZHANG, J.; VICENTE, V. A.; XI, L.; DE HOOG, G. S. Molecular identification of *Penicillium marneffe* using Rolling circle amplification. **Mycoses**. v.54, n.6, p. 751-759, 2011.

SUZAKI, A.; KIMURA, M.; KIMURA, S.; SHIMADA, K.; MIYAJI, M.; KAUFAMN, L. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. **Kansenshogaku Zasshi**. v.69, p. 444–449, 1995.

TAYLOR, M. L.; CHÁVEZ-TAPIA, C. B.; REYES-MONTES, M. R. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. **Fungal Genetics and Biology**.v.30, n. 3, p. 207-212, 2000.

TAYLOR, M. L.; RUÍZ-PALACIOS, G. M.; REYES-MONTES, M. R. *et al.* Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**.v.45, n.3, p. 435-441, 2005.

TAYLOR, J. W. One fungus = Onename: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. **IMA Fungus**.v.2, n.2, p. 113-120, 2011.

THOMAS, D. C.; NARDONE, G. A.; RANDALL, S. K. Amplification of padlock probes for DNA diagnostics by cascade rolling circle amplification or the polymerase chain reaction. **Arch Pathol Med**. v.123, p. 1170-1176, 1999.

TIAN, X.; SHEARER, G. J. Cloning and analysis of mold-specific genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Gene**, v.275, n.1, p. 107-114, 2001.

TIAN, X.; SHEARER, G. J. The mold-specific *MS8* gene is required for normal hyphal formation in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryotic Cell**., v.1, n.2, p. 249-256, 2002.

TIMMERMAN, M. M., WOODS, J. P. Potential role for extracellular glutathione-dependent ferric reductase in utilization of environmental and host ferric compounds by *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun**. v. 69, p. 7678, 2001.

TONG, Z.; KONG, F.; WANG, B.; ZENG, X.; GILBERT, G. L. A practical method for subtyping of *Streptococcus agalactiae* serotype III of human origin, using rolling circle amplification. **Journal of Microbiological Methods**, n.70, p. 39-44, 2007.

TSUI, C. K. M.; WOODHALL, J.; CHEN, W.; LÉVESQUE, C. A.; LAU, A.; SCHOEN, C. D.; BASCHIEN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; DE HOOG, G. S. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. **IMA fungus**.v.2, n.2, p. 177-189, 2011.

VEERAVAGU, A.; LUDWIG, C.; CAMARA-QUINTANA, J. Q.; JIANG, B. *et al.* Fungal infection of a ventriculoperitoneal shunt: histoplasmosis diagnosis and treatment. **World Neurosurgery**.v.80, p. 222, 2013.

VERGNAUD, G. Polymers of random short oligonucleotides detect polymorphic loci in the human genome. **Nucleic Acids Res**. v.17, n.19, p. 7623-7630, 1989.

VICENTE, V. A. Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose. ESALQ/USP (Tese Doutorado), Piracicaba, 181p, 2000.

- WANG, T. L.; CHEAH, J. S.; HOLMBERG, K. Case report and review of disseminated histoplasmosis in South-East Asia: Clinical and epidemiological implications. **Trop. Med. Int. Health.** v.1, p. 35–42, 1996.
- WANG, B.; POTTER, S. J.; LIN, Y.; CUNNINGHAM, A. L. *et al.* Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. **Journal of Clinical Microbiology.** v.43, n.5, p. 2339-2344, 2005.
- WHEAT, L. J.; GARRINGER, T. BRIZENDINE, E.; CONNOLLY, P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v.43, p. 29-37, 2002.
- WHEAT, L.J.; KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** v.17, p. 1-19, 2003.
- WHEAT, L. J.; CONCES, D.; ALLEN, S. D.; BLUE-HNIDY, D.; LOYD, J. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis and management. **Semin. Respir. Crit. Care. Med.** v25, p. 129-144, 2004.
- WHEAT, L. J.; MUSIAL, C. E.; JEMY-AVITAL, E. Diagnosis and management of central nervous system histoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases.** v.40, p. 844-852, 2005.
- WHEAT, L. J. Improvements in diagnosis of histoplasmosis. **Expert Opin. Biol. Ther.** v.6, p. 1207-1221, 2006.
- WHEAT, L. J.; FREIFELD, A. G.; KLEIMAN, M. B.; BADDLEY, J. W.; MCKINSEY, D. S.; LOYD, J. E. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.** v. 45, p. 807-825, 2007.
- WHEAT, L. J. Approach to the diagnosis of the endemic mycoses. **Clinical Chest Med.** v. 30, n. 8, p. 379–389, 2009.
- WHITE, T. J., BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. INNIS, M. A.; GELFAND, D. A.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **Academic Press**, San Diego, U.S.A., 1990.
- WIEDERHOLD, N. P.; LEWIS, R. E. Antifungal activity against *Scedosporium* species and novel assays to assess antifungal pharmacodynamics against filamentous fungi. **Med. Mycol.** v.47, p. 422-432, 2009.
- WILLIAMS, B.; FOJTASEK, M.; CONNOLLY-STRINGFIELD, P. *et al.* Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection during an outbreak in Indianapolis. **Ind. Arc. Pathol. Lab. Med.** v.118, n.12, p. 1205-1208, 1994.
- WOLF, J. E.; KERCHBERGER, V.; KOBAYASHI, G. S.; LITTLE, J. R. Modulation of the macrophage oxidative burst by *Histoplasma capsulatum*. **J. Immunol.** v.138, p. 582-586, 1987.

WOODS, J. P.; HEINECKE, E. L.; LUECKE, J.W.; MALDONADO, E. *et al.* Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Semin.Respir. Infect.** v.16, p. 91-101, 2001.

WOODS, J. P. *Histoplasma capsulatum*: Molecular genetics, pathogenesis and responsiveness to environment. **Fungal Genetic Biology**, v.35, p. 81-97, 2002.

WOODS, J. P.; CALDERONE, R. A.; CIHLAR, R. L. Dimorphism in human pathogens. **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**, p. 99-113, 2002.

ZHANG, X.; GIBSON JUNIOR, B.; DALY, T. M. Evaluation of commercially available reagents for the diagnosis of *Histoplasma capsulatum* in immunocompromised patients, **Journal of Clinical Microbiology**. 2013. doi: 10.1128/JCM.02298-13.

ZHAO, W.; MONSUR ALI, M.; BROOK, M. A.; LI, Y. Rolling circle amplification: applications in nanotechnology and bidetection with functional nucleic acids. **Angew.Chem. Int. Ed.** v.47, n.34, p. 6330-6337, 2008.

ZHOU, X.; KONG, F.; SORREL, T. C.; WANG, H.; DUAN, Y.; CHEN, S. C. A. Practical method for detection and identification of *Candida*, *Aspergillus* and *Scedosporium* spp. by use of rolling circle amplification. **Journal of Clinical Microbiology**.v.46, n.7, p. 2423-2427, 2008.

ZÖLLNER, M. S.; REZENDE, K. M.; BIRMAN, S.; ELIAS, C. P.; ARISAWA, E. Â.; SANTOS, M. A. Clinical and evolutionary characteristics of four patients with pulmonary histoplasmosis reported in the Paraíba Paulista Valley region. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 43, p. 599-601, 2010.

ZOU, B.; MA, Y.; WU, H.; ZHOU, G. Signal amplification by rolling circle amplification on universal flaps yielded from target-specific invasive reaction. **Analyst**. n.137, p. 729-734, 2012.

## ANEXOS

ANEXO I - Sequências nucleotídicas do espaçador interno transcrito (ITS) do DNAr de <i>Ajellomyces capsulatus</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i> obtidas no banco de dados do <i>Genbank</i> e utilizadas para confecção das sondas cadeado.....	72
ANEXO II – Artigo DEVELOPMENT OF A ROLLING CIRCLE AMPLIFICATION (RCA) METHOD TO DETECT <i>Histoplasma capsulatum</i> DNA IN CLINICAL SAMPLES a ser submetido para publicação.....	78
ANEXO III – Artigo de revisão HISTOPLASMOSIS: DIAGNOSIS OF THE DISEASE a ser submetido para publicação.....	79



ANEXO I - Sequências nucleotídicas do espaçador interno transcrito (ITS) do DNAr de *Ajellomyces capsulatus* e *Histoplasma capsulatum* obtidas no banco de dados do *Genbank* e utilizadas para confecção das sondas cadeado.

Número	Linhagem	Origem	Isolado	GenBank	Sequência
1	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	-	ACU35645	267 pb
2	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	-	HM439693	549 pb
3	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	México	EH315	AB071828	566 pb
4	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	México	EH372	AB071831	558 pb
5	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	México	EH325	AB071829	558 pb
6	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Guatemala	EH332	AB071830	551 pb
7	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	IFM40752	AB055229	540 pb
8	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Austrália	A4a	AB071843	541 pb
9	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Equador	E1	AB071827	540 pb
10	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Indonésia	H141	AB055235	541 pb
11	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Inglaterra	H142	AB055236	540 pb
12	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	H150	AB055233	541 pb
13	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	H152	AB071825	540 pb
14	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Austrália	H157	AB071844	541 pb
15	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	China	H177	AB055237	540 pb
16	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	China	H178	AB071840	541 pb
17	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	H196	AB055234	541 pb
18	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	H200	AB071826	541 pb
19	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	H5	AB071821	540 pb
20	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H59	AB055232	540 pb
21	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H60	AB071823	541 pb
22	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H74	AB071824	541 pb
23	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	H79	AB071770	539 pb
24	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	H84	AB071822	539 pb
25	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Tailândia	HP12	AB055240	541 pb
26	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Tailândia	HP13	AB055241	541 pb
27	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Tailândia	HP18	AB055242	541 pb
28	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Tailândia	HP23	AB055243	541 pb
29	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Tailândia	HP3	AB055238	541 pb
30	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Tailândia	HP4	AB055239	541 pb
31	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	IFM41329	AB055228	539 pb
32	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Japão	IFM41330	AB071842	542 pb
33	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	IFM41659	AB055230	539 pb
34	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Japão	IFM47750	AB055245	538 pb
35	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Japão	IFM49109	AB055244	542 pb
36	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Argentina	IFM50248	AB055231	540 pb
37	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Argentina	IFM50249	AB071832	540 pb
38	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	-	AF156892	538 pb
39	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	-	AF162917	499 pb
40	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	-	EU326529	459 pb

continua

continuação

Número	Linhagem	Origem	Isolado	GenBank	Sequência
41	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	-	EU326530	493 pb
42	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	-	DQ979875	542 pb
43	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Costa Rica	-	DQ980237	456 pb
44	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	13	JF826014	380 pb
45	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	157CS	GU320938	418 pb
46	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	16	JF826015	380 pb
47	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	17	JF826016	380 pb
48	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	177CSS	GU320985	418 pb
49	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	184PRS	GU320986	418 pb
50	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	187LCT	GU320937	418 pb
51	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	190CLC	GU320936	418 pb
52	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	3	JF826013	380 pb
53	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	3237	GU320942	418 pb
54	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	3356	GU320971	418 pb
55	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	3416	GU320972	418 pb
56	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	3612	GU320973	418 pb
57	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	3688	GU320974	418 pb
58	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	385BG	GU320953	418 pb
59	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	4334	GU320975	418 pb
60	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	4631	GU320976	418 pb
61	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	6406	GU320977	418 pb
62	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	6503	GU320978	418 pb
63	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	78624	GU320970	418 pb
64	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	84476	GU320983	418 pb
65	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	84502	GU320939	419 pb
66	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	84564	GU320984	418 pb
67	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	9291	GU320940	418 pb
68	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	9414	GU320941	418 pb
69	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	A1 1 2R8	JQ218335	535 pb
70	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	A2 2 2R8	JQ218336	538 pb
71	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	A3 3 R8	JQ218337	536 pb
72	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	A4 25 2R8	JQ218358	537 pb
73	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	A5 26 2R8	JQ218359	535 pb
74	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	AC02	GU320959	418 pb
75	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	AC05	GU320980	418 pb
76	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	B1	JQ218338	535 pb
77	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	B2	JQ218339	535 pb
78	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	B3	JQ218340	534 pb
79	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	B670	GU320979	418 pb
80	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	C1	JQ218341	535 pb
81	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	C2	JQ218342	535 pb
82	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	C3	JQ218343	536 pb
83	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	CADAM	GU320967	418 pb

continuação

Número	Linhagem	Origem	Isolado	GenBank	Sequência
85	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	CDCB6160	AF458085	469 pb
86	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	CDCB6206	AF458086	469 pb
87	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	D1 10 2R8	JQ218344	536 pb
88	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	D2 11 2R8	JQ218345	536 pb
89	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	D3 12 2R8	JQ218346	536 pb
90	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	E1 13 2R8	JQ218347	535 pb
91	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	E2 14 2R8	JQ218348	535 pb
92	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	E3 15 2R8	JQ218349	535 pb
93	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	EP02	GU320960	418 pb
94	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	ES55	GU320950	418 pb
95	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	ES56	GU320949	418 pb
96	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	ES60	GU320948	418 pb
97	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	ES62	GU320947	418 pb
98	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	F1 16 2R8	JQ218350	535 pb
99	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	F2 17 2R8	JQ218351	535 pb
100	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	F3 18 2R8	JQ218352	535 pb
101	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	G1 19 2R8	JQ218353	534 pb
102	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	G3 21 2R8	JQ218354	534 pb
103	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	GO1820	GU320954	418 pb
104	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	GO764	GU320955	418 pb
105	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	H1 22 2R8	JQ218355	538 pb
106	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	H2	AF322377	608 pb
107	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	H2 23 2R8	JQ218356	533 pb
108	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	H3 24 2R8	JQ218357	536 pb
109	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H62	AF322379	609 pb
110	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H64	AF322380	609 pb
111	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H67	AF322381	609 pb
112	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H68	AF322382	609 pb
113	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H70	AF322383	608 pb
114	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H71	AF322384	609 pb
115	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Panamá	H81	AF322385	607 pb
116	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	H9	AF322378	607 pb
117	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	Hc1	EU048555	485 pb
118	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	Hc2	EU048556	486 pb
119	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	IGS19	GU320944	418 pb
120	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	IGS4/5	GU320945	418 pb
121	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	IT04	GU320961	418 pb
122	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	JIEF	GU320956	418 pb
123	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	MS53	GU320981	418 pb
124	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RE5646	GU320958	418 pb
125	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RE9463	GU320957	418 pb

continua

continuação

Número	Linhagem	Origem	Isolado	GenBank	Sequência
85	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	CDCB6160	AF458085	469 pb
86	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	CDCB6206	AF458086	469 pb
87	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	D1 10 2R8	JQ218344	536 pb
88	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	D2 11 2R8	JQ218345	536 pb
89	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	D3 12 2R8	JQ218346	536 pb
90	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	E1 13 2R8	JQ218347	535 pb
91	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	E2 14 2R8	JQ218348	535 pb
92	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	E3 15 2R8	JQ218349	535 pb
93	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	EP02	GU320960	418 pb
94	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	ES55	GU320950	418 pb
95	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	ES56	GU320949	418 pb
96	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	ES60	GU320948	418 pb
97	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	ES62	GU320947	418 pb
98	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	F1 16 2R8	JQ218350	535 pb
99	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	F2 17 2R8	JQ218351	535 pb
100	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	F3 18 2R8	JQ218352	535 pb
101	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	G1 19 2R8	JQ218353	534 pb
102	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	G3 21 2R8	JQ218354	534 pb
103	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	GO1820	GU320954	418 pb
104	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	GO764	GU320955	418 pb
105	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	H1 22 2R8	JQ218355	538 pb
106	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	H2	AF322377	608 pb
107	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	H2 23 2R8	JQ218356	533 pb
108	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	H3 24 2R8	JQ218357	536 pb
109	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H62	AF322379	609 pb
110	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H64	AF322380	609 pb
111	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H67	AF322381	609 pb
112	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H68	AF322382	609 pb
113	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H70	AF322383	608 pb
114	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Colômbia	H71	AF322384	609 pb
115	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Panamá	H81	AF322385	607 pb
116	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Estados Unidos	H9	AF322378	607 pb
117	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	Hc1	EU048555	485 pb
118	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	Hc2	EU048556	486 pb
119	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	IGS19	GU320944	418 pb
120	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	IGS4/5	GU320945	418 pb
121	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	IT04	GU320961	418 pb
122	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	JIEF	GU320956	418 pb
123	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	MS53	GU320981	418 pb
124	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RE5646	GU320958	418 pb
125	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RE9463	GU320957	418 pb

continua

continuação

Número	Linhagem	Origem	Isolado	GenBank	Sequência
126	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RPS45	GU320946	418pb
127	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RPS51	GU320962	418pb
128	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RPS86	GU320963	418pb
129	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RS01	GU320982	418pb
130	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RS09	GU320943	418pb
131	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	RS36	GU320969	418pb
132	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	SP2414	GU320951	418pb
133	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	SP49	GU320952	418pb
134	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	SUMS0035	FJ011535	610 pb
135	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	TI01	GU320964	418pb
136	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	TI05	GU320965	418pb
137	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Brasil	TI14	GU320966	418pb
138	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	A1	AF129538	490 pb
139	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	A2	AF129539	489 pb
140	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	A3	AF129540	491 pb
141	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	B	AF129541	485 pb
142	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	C	AF129542	489 pb
143	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	D	AF129543	484 pb
144	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	E	AF129544	489 pb
145	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	F	AF129545	489 pb
146	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	G	AF129546	490 pb
147	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	H	AF129547	490 pb
148	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	JER2004	DQ467835	541 pb
149	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	LDCF1001	HQ822530	511 pb
150	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	UAMH3536	AF038354	1188 pb
151	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Desconhecido	UAMH7141	AF038353	1190 pb
152	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Bélgica	-	AF322386	613 pb
153	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Bélgica	-	AB061781	545 pb
154	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Egito	-	AF322387	609 pb
155	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Panamá	-	Y13994	209 pb
156	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Senegal	-	Y13995	209 pb
157	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Desconhecido	CBS176.57	Y13999	201 pb
158	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Desconhecido	CBS205.35	Y13997	209 pb
159	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Desconhecido	CBS478.64	Y14000	201 pb
160	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Desconhecido	TIMM0740	Y13998	185 pb
161	<i>Histoplasma capsulatum</i>	África do Sul	H143	AB055246	545 pb
162	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Senegal	H147	AB055247	550 pb
163	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Desconhecido	IFM5415	AB055248	550 pb
164	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Desconhecido	H87	AB071833	551 pb
165	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Desconhecido	IFM41332	AB071834	551 pb
166	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Uganda	IFM50954	AB071835	546 pb

continua

continuação

Número	Linhagem	Origem	Isolado	GenBank	Sequência
167	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Egito	H95	AB055249	541 pb
168	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Polônia	H174	AB071836	541 pb
169	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Egito	H194	AB071837	541 pb
170	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Desconhecido	IFM41334	AB071839	541 pb
171	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Japão	IFM41612	AB071841	541 pb
172	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Desconhecido	IFM5418	AB071838	541 pb
173	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Brasil	E2	-	574 pb
174	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Brasil	E17	-	818 pb
175	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Brasil	E1	-	807 pb
176	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Brasil	E21	-	816 pb
177	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Brasil	E4	-	818 pb

**DEVELOPMENT OF A ROLLING CIRCLE AMPLIFICATION (RCA)  
METHOD TO DETECT *Histoplasma capsulatum* DNA IN CLINICAL SAMPLES**

FURUIE, J. L.<sup>1,2</sup>; NASCIMENTO, M. M. F.<sup>1,3</sup>; SUN, J.<sup>4</sup>; VICENTE, V. A.<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, CEP 81531–980, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduation Program of Bioprocess Engineering and Biotechnology, CEP 81531–980, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>3</sup> Post-Graduation Program of Microbiology, Parasitology e Pathology, CEP 81531–980, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>4</sup> Guangdong Provincial Institute of Public Health, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong, China

\*Corresponding author: (Phone: 55 41 33605335. Fax: 55 41 33605113. E-mail: [vicente@ufpr.br](mailto:vicente@ufpr.br))

## **Introduction**

*Histoplasma capsulatum* is a dimorphic fungus that causes histoplasmosis. In immunocompromised persons, *H. capsulatum* can disseminate throughout the body, causing progressive disseminated histoplasmosis (PDH), characterized by fever, weight loss, and hepatosplenomegaly. PDH can cause death without early diagnosis and antifungal intervention (SCHEEL *et al.*, 2013).

The fungus grows in soil enriched with bird and bat droppings and thus is found frequently in areas where large numbers of these animals including the attics and eaves of houses and structures (REIDE, SCHAFER 1999; HAY, 1993).

The diagnosis of histoplasmosis is based on the results of clinical evaluation, culture of the organism, and various laboratory tests. Isolation and culture of *H. capsulatum* var. *capsulatum* provide a definitive diagnosis (GUEDES *et al.*, 2003).

## HISTOPLASMOSIS: DIAGNOSIS OF THE DISEASE

FURUIE, J. L.<sup>1,2</sup>; GELINSKI, J. M. L. N.<sup>3</sup>;  
SOCCOL, C. R.<sup>2</sup>; VICENTE, V. A.<sup>1,2,4 \*</sup>

<sup>1</sup> Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup> Post-Graduation Program of Bioprocess Engineering and Biotechnology, Curitiba, Paraná, Brazil.

<sup>3</sup> Post-Graduation Program of Science and Biotechnology, Videira, Santa Catarina, Brazil.

<sup>4</sup> Post-Graduation Program of Microbiology, Parasitology and Pathology, Curitiba, Paraná, Brazil.

\*Corresponding author: (Phone: +55 41 33605335. Fax: +55 41 33605113. E-mail: vaniava63@gmail.com)

### Abstract

The histoplasmosis is a systemic disease with worldwide cases and is considered one of the most commonly reported fungal infections in immunocompromised patients. It is caused by the dimorphic fungus *H. capsulatum* after inhalation of spores present in soil contaminated by feces mainly of certain birds and bats. The manifestation of lung histoplasmosis occurs in the host where the change of temperature to 37°C causes conversion of *H. capsulatum* cells in pathogenic yeast. Although the disease usually show it in its primary form in healthy individuals, the majority of cases involving AIDS and immunocompromised patients, shows signs of a potentially fatal infection. The diagnosis normally has been established by the combination of clinical, radiological, epidemiological, microbiological and laboratory examinations. An accurate interpretation of laboratory data is important to ensure the most appropriate treatment in each case. Molecular techniques have been used for a more rapid and accurate diagnosis of fungal diseases, including histoplasmosis. These techniques aim at detecting DNA from *H. capsulatum* in clinical samples and allow performing evolutionary analyzes studies of genetic diversity and several other molecular epidemiology studies. In this review we discuss about the epidemiology, classical diagnostics and molecular diagnostics of infections caused by the pathogen *H. capsulatum*.

**Key words:** Fungal infection, *Histoplasma capsulatum*, Molecular diagnosis.